

**DIE NATUR DER BAKTERIOZINE
VON
ACINETOBACTER CALCOACETICUS
VAR. ANITRATUS**

CLAUDIA GREPPMAIR

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554624_0053

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. F. Deinhardt

DIE NATUR DER BAKTERIOZINE

VON

ACINETOBACTER CALCOACETICUS

VAR. ANITRATUS

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades in der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Claudia Greppmair

aus

Olching

Jahr

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. A. Bauernfeind

Mitberichterstatter : 1. Prof. Dr. F. Deinhardt
2. Prof. Dr. E. Weissenbocher

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.1986

DANKSAGUNG

Besonders herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Bauernfeind für die Überlassung des Themas, sowie seine Unterstützung und Führung bei dessen Bearbeitung.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Prof. Dr. F. Deinhardt für die Bewilligung eines Arbeitsplatzes.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen G. Hörl und vor allem C. Petermüller danke ich für die Einführung in experimentelles Arbeiten.

Nicht zuletzt danken möchte ich Herrn H. Podewils für die Bereitstellung eines EDV-Schreibsystems zur formellen Fertigung, sowie meinem Ehemann für dessen Geduld und Hilfsbereitschaft während der Entstehung dieser Arbeit.

GEWIDMET

MEINEN ELTERN

Eduard und Anna Maria Strauch

INHALT

A. EINLEITUNG

I. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1
II. Bakteriozine.....	4

B. MATERIAL

I. Stämme.....	6
II. Medien, Reagenzien.....	9
III. Geräte.....	9

C. METHODEN

I. Bakteriozine in Flüssigkulturen.....	10
1. Bakteriozinproduktion in flüssigem Nährmedium.....	10
a. Bakteriozinnachweis in TSB.....	10
b. Variationen der Methode.....	11
- Lochtest.....	11
- Vorgezogene Chloroformbehandlung.....	11
- Bebrüten bei Zimmertemperatur.....	11
- Aufbringen einer unbehandelten Probe.....	12
auf den Indikatorrasen	
2. Bakteriozinproduktion in Flüssigmedien erhöhter Viskosität.....	12
3. Bestimmung des Sedimentationsverhaltens (Saccharosegradienten).....	12
4. Bakteriophagennachweis.....	13
II. Bakteriozine in festem Nährmedium	
1. Nachweis von Bakteriozinproduktion in TSA.....	14
a. Die Multipoint-Inoculatormethode.....	14
b. Die Radialausstrichmethode.....	17
2. Bakteriophagennachweis.....	17
3. Verfahren zur Charakterisierung der Bakteriozine.....	18
a. Temperaturstabilität der Bakteriozine.....	18

b. Trypsinbehandlung.....	19
c. Bestimmung der relativen Bakteriozingröße.....	20
- Diffusionstest mit Producereinzelskolonien.....	20
- Diffusionstest mit Producerrasen.....	20
- Dialyse des Produceragars gegen NaCl.....	20
- Prüfung der Zellophandurchgängigkeit.....	21

D. ERGEBNISSE

I. Bakteriozine in Flüssigkulturen.....23

1. Bakteriozinproduktion in flüssigem Nährmedium.....	23
a. Eigenheiten der Bakteriozinsynthese bzw. -wirkung.....	23
b. Hemmhofbildung durch Producerkolonien.....	26
c. Stabilität der Bakteriozine.....	27
2. Bakteriozinproduktion in Flüssigmedien erhöhter Viskosität.....	27
a. Bacto-Agarzusatz und Konsistenz des Nährmediums.....	27
b. Verhalten der einzelnen Producer.....	28
3. Bestimmung des Sedimentationsverhaltens (Lage der 'Peaks' im Saccharosegradienten).....	29
4. Nachweis und Charakterisierung von Bakteriophagen.....	29

II. Bakteriozine in festen Nährmedium.....31

1. Bakteriophagenausschluß.....	31
2. Qualitative Unterscheidung einzelner Indikatoren.....	31
3. Eigenschaften der Bakteriozine.....	32
a. Temperaturstabilität.....	32
- Bakteriozinspezifische Unterteilung der Producer.....	32
- Optimierung der Methode.....	33
b. Trypsinempfindlichkeit.....	38
c. Relative Größe der Bakteriozine.....	40
- Bakteriozindiffusion um Producereinzelskolonien.....	40
- Bakteriozindiffusion um den Producerrasen.....	40
- Dialysierbarkeit der Bakteriozine.....	42
- Zellophandurchgängigkeit.....	42

4. Klassifizierung der Bakteriozine.....	47
E. DISKUSSION.....	49
I. Bakteriozine in Flüssigkulturen.....	49
II. Bakteriozine in festem Nährmedium.....	52
1. Temperaturstabilität der Bakteriozine.....	52
2. Trypsinempfindlichkeit der Bakteriozine.....	53
3. Relative Größe der Bakteriozine.....	54
III. Die Natur der Bakteriozine von <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> var. <i>nitratatus</i> unter Berücksichtigung bereits bekannter Hemmsubstanzen.....	55
F. ZUSAMMENFASSUNG.....	57
G. LITERATURANGABEN.....	59
TABELLEN UND ABBILDUNGEN	
TAB 1.: Bakteriozine in Kulturüberständen.....	23
TAB 2.: Kinetik der Bakteriozinbildung.....	25
TAB 3.: Zusammensetzung und Konsistenz von 'Übergangsmedien'.....	27
TAB 4.: Bakteriozinproduktion in Abhängigkeit von der Konsistenz des Nährmediums.....	28
TAB 5.: Differenzierung der Bakteriophagen anhand ihrer Plaques.....	30
TAB 6.: Optimale Indikatoren für vier Producerstämme.....	31
TAB 7.: Thermolabilität der Bakteriozine und Differenzierung der Indikatoren.....	34
TAB 8.: Klassifizierung der Bakteriozine nach therm. Stabilität.....	36
TAB 9.: Producer trypsinresistenter bzw. trypsinempfindlicher Bakteriozine.....	39
TAB 10.: Producer zellophangängiger bzw. zellophanundurchgängiger Bakteriozine.....	43

TAB 11.: Klassifizierung von Bakteriozinen bei <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> var. <i>anitratus</i>	48
ABB 1.: Anordnung der Beimpfungsstifte (Pins) beim Pointen der Producer.....	14
ABB 2.: Anordnung der Beimpfungsstifte (Pins) beim Pointen der Indikatoren.....	15
ABB 3.: Bewertung des Indikatorwachstums.....	16
ABB 4.: Producerwachstum und Bakteriozinproduktion.....	24
ABB 5.: Hemmhöfe des Producers 30208 auf Indikatorrasen 20557.....	26
ABB 6.: Bakteriophagenplaques (Producer 30208, Indikator 20557).....	30
Abb 7 u.8.: Differenzierung der Bakteriozine nach ihrer Diffusionsfähigkeit.....	41
ABB 9 - 14.: Zellophandurchgängigkeit verschiedener Bakteriozine....	44

A. EINLEITUNG

I. *Acinetobacter calcoaceticus*

Die Bezeichnung '*Acinetobacter calcoaceticus*' entstand 1971 (30).

In der Zeit davor wurde diese Bakterienart mit einer ganzen Reihe von Synonymen belegt, so z.B. '*Mima polymorpha*', '*Achromobacter anitratus*' oder '*Moraxella lwoffii*' (37). Im Jahre 1971 beschloß das 'International Subcommittee on the Taxonomy of *Moraxella* and Allied Bacteria', daß die Gattung *Acinetobacter* nur eine einzige Art, *Acinetobacter calcoaceticus*, beinhalten sollte, die ihrerseits wieder, aufgrund von Hämolysefähigkeit, Wachstum auf *Salmonella-Shigella*-Agar (SS-Agar), Produktion einer Gelatinase oder Säureentstehung beim Glucoseabbau in vier Biotypen: *anitratus*, *hämolyticus*, *lwoffii* und *alcaligenes*, unterteilt wurden (30). Zum besseren Verständnis der neuen Nomenklatur und besonders zur richtigen Einordnung und Unterscheidung der Gattungen '*Acinetobacter*' und '*Moraxella*', trug auch der 1973 von Henriksen veröffentlichte Literaturüberblick bei (21).

Sämtliche Biotypen des *Acinetobacter calcoaceticus* erwiesen sich als Nonfermenter, oxidasenegativ und unbeweglich (30), wobei besonders letztere Eigenschaft eine sichere Unterscheidung von *Moraxella*, *Pseudomonas* oder *Alcaligenes*stämmen erlauben und im Zweifelsfall zudem eine Differenzierung auf der Basis unterschiedlicher Antibiotikaempfindlichkeit der einzelnen Stämme nützlich sein kann (19).

Auch eine, aufgrund des gramnegativen Verhaltens und der häufigen Diplokokkenmorphologie von *Acinetobacter*stämmen befürchtete Verwechslung mit Gonokokken dürfte, in Anbetracht der oben beschriebenen Unterscheidungsmöglichkeiten, ausgeschlossen sein (18).

Was das Vorkommen der *Acinetobacter* betrifft, so sind diese Organismen so gut wie überall zu finden, so z.B. im Erdreich und im Wasser (21), aber auch im Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt des Menschen (30).

Die nachgewiesene Besiedelung von Waschbecken, Respiratoren oder Luftbefeuchtern in Kliniken (16), und nicht zuletzt ihre Fähigkeit, sogar in Seifenlösungen, bzw. Desinfektionsmitteln zu überleben (18), scheinen schließlich zu der gerade in letzter Zeit zunehmenden Bedeutung von *Acinetobacter*stämmen als opportunistische Hospitaliskeime beigetragen zu haben. So verursachen die im allgemeinen wenig virulenten Keime vor allem bei älteren, oder in ihrer Abwehr geschwächten Menschen, ernsthafte Erkrankungen (21), wie z.B. Pneumonien (24), Meningitiden (17) und Infektionen des Urogenitaltraktes (16). Der Infektionsweg scheint dabei weniger über von mehreren Patienten gemeinsam benutzten Waschbecken bzw. Respiratoren zu führen, als vielmehr über das Pflegepersonal und die Patienten selbst, deren Hände meist von den Bakterien besiedelt sind, wie French et. al. in einer 1980 veröffentlichten Studie nachweisen konnten (16).

Ein weiteres, Infektionen mit *Acinetobacter* sicherlich erschwerendes Problem betrifft die antibiotische Therapie. Die meisten dieser Organismen sind resistent gegen Penicilline, Cephalosporine und Chloramphenicol, aber empfindlich für Aminoglycoside, Sulfonamide und Tetracycline (30,25); das einzige zur Zeit wirksame β -Lactam-Antibiotikum scheint das N-Formimidoyl-Thienamycin zu sein (13). Interessant ist auch die, in diesem Zusammenhang beobachtete unterschiedliche Resistenz der einzelnen Biotypen gegen bestimmte Antibiotika.

So berichten Hoffmann et. al. z.B. über eine größere Sensibilität des Typs lwoffii für Chloramphenicol und Erythromycin, im Vergleich zu *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* (23).

In den letzten Jahren scheinen sich nosokomiale Infektionen, die von multiresistenten *Acinetobacter*stämmen verursacht wurden, zu häufen. So beschreiben z.B. French et. al. schwere Infektionen auf einer urologischen Station (1980), deren Erreger, ein *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*, vollständige Resistenz gegen 18 verschiedene Antibiotika zeigte und nur gegenüber Nalidixinsäure, Colistin, Tobramycin und Amicacin sensitiv war (16). Einen ähnlichen Fall einer Krankenhausepidemie durch *Acinetobacter anitratus* untersuchte auch Holton, der in seiner Zweijahresstudie zudem eine gehäufte Inzidenz während der Herbst- und Wintermonate feststellt (25).

In beiden Fällen konnte keine extrachromosomale DNS, kein Plasmid, in den Erregern nachgewiesen werden, was eventuell die Multiresistenz dieser Organismen erklärt hätte, zumal Hinchliffe et. al. ein übertragbares Plasmid mit der Resistenz für Sulfonamide und der Fähigkeit zur Mobilisierung zweier, nicht transmissibler Resistenzdeterminanten für Tetracycline und Neomycin, aus einem *Acinetobacter* isolieren konnten (22). Diese Funktion der *Acinetobacter* als Träger von Resistenzfaktoren könnte noch große Bedeutung, besonders in Krankenhäusern, erlangen (38).

Dies wird bestätigt durch den Nachweis von plasmidcodierten, aminoglycosid-modifizierenden Enzymen in dieser Spezies (12,31). Das durch die zunehmende Bedeutung des *Acinetobacter* als Hospitalkeim dringendste Problem liegt in der nach wie vor völlig unzureichenden, epidemiologischen Typisierbarkeit der Klinikisolate. Weder serologische Ansätze, noch der Versuch einer Phagentypisierung erbrachten ein brauchbares Typisierverfahren (38).

Vor diesem Hintergrund bietet eine Bakteriozintypisierung von *Acinetobacter* diverse Möglichkeiten zur epidemiologischen Analyse und damit nicht zuletzt einer gezielteren Prävention dieser nosokomialen Probleminfektionen.

II. Bakteriozine

Der Terminus 'Bakteriozin' für Stoffwechselprodukte von Bakterien, die letal auf Organismen derselben, oder eng verwandter Spezies wirken, wurde 1953 von Jacob et. al. geprägt (28). Zu diesem Zeitpunkt hatte Fredericq, der eigentliche 'Vater der Bakteriozinforschung', bereits 17 verschiedene Typen von Colicinen, antibiotisch wirkende Substanzen von *E.coli*-Stämmen, klassifiziert und somit die Grundlagen für die Colicinforschung gelegt (33).

Die meisten der bisher untersuchten Bakteriozine lassen sich in zwei große Gruppen einteilen:

- a. Bakteriozine aus Protein, bzw. Protein-Lipopolysaccharidkomplexen, z.B. Colicine,
- b. Bakteriozine aus Bakteriophagenfragmenten, meist mit Phagenschwanzstrukturen, z.B. Pyocine der *Pseudomonas*-Stämme (14,20,33).

Die Ähnlichkeit zwischen Bakteriophagen und Bakteriozinen zeigt sich auch auf anderer Ebene. So ist z.B. die Synthese beider durch UV-Bestrahlung (27) oder Mitomycin C (15) induzierbar.

Zudem ist die letale Wirkung sowohl der Bakteriophagen, als auch der Bakteriozine an die Anwesenheit spezifischer Rezeptoren an der Zelloberfläche der jeweils sensiblen Zelle gebunden (33). Sabet und Schnaitman (34) gelang es, einen Colicinrezeptor zu isolieren, den sie dann als Protein mit Kohlehydratanteil klassifizierten.

Dieser Kohlehydratanteil konnte jedoch in neuesten Untersuchungen nicht bestätigt werden, weshalb der Colicin E3 -Rezeptor nun als reines Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 60000 D gilt (26). Als Wirkungsmechanismen von Bakteriozinen wurden in den 60er Jahren Blockade der DNS- bzw. Makromolekülsynthese, Hemmung der energieliefernden Prozesse, z.B. der oxydativen Phosphorylierung, oder eine Störung der Permeasefunktion, bzw. des K⁺ - Transportes erörtert (33). Letzteres konnte durch neuere Untersuchungen von Wendt (39), der eine rasche, fast vollständige Verarmung der Bakterienzelle an K⁺ durch Bakteriozinwirkung nachwies, bestätigt werden.

Neben Bakteriozinen gramnegativer Arten, wurden inzwischen auch Bakteriozine von grampositiven Organismen untersucht, so z.B. Staphylococcine, Streptococcine oder Lactocine. Ein Unterschied zu gramnegativen Bakteriozinen, liegt in einem weiteren Aktivitätsspektrum der Bakteriozine grampositiver Keime, das nicht nur verwandte oder gleiche Spezies erfaßt, sondern sich z.Tl. auch auf gramnegative Bakterien erstreckt (36).

Die Bedeutung der Bakteriozine aus ökologischer Sicht und ihre evtl. Nutzbarkeit wurden diskutiert (20).

Ein epidemiologisch bedeutsamer Aspekt der Bakteriozinogenie liegt in ihrer Verwendbarkeit zur Typisierung von Bakterienisolaten aufgrund von Bakteriozinproduktion bzw. -empfindlichkeit, so z.B. für *Pseudomonas* (7,8), *Klebsiellen* (3,5), *Enterobacter cloacae* (6) oder *Providencia rettgeri* (10,11). Sie bietet neben Serotypisierung oder Lysotypie einen wesentlichen zusätzlichen Marker auf Subspeziesebene.

Oberstes Gebot für die Brauchbarkeit von Typisierungsergebnissen ist die Reproduzierbarkeit. Die dafür notwendige Standardisierung der Methodik setzt die möglichst genaue Kenntnis der Natur der Hemmstoffe voraus.

Deshalb hat sich diese Arbeit die biologische bzw. biochemische Charakterisierung und Klassifizierung von Bakteriozinen bei *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* zum Ziel gesetzt, nachdem von Rattenberger (32) das Vorkommen von *Acinetobacter*-Bakteriozinen und deren Brauchbarkeit für die Bakteriozintypie erstmals beschrieben worden sind.

B. MATERIAL

I. Stämme

Acinetobacter calcoaceticus, ERLANGEN-NÜRNBERG

(Dr. H.J. Boltze, Institut für klinische Mikrobiologie und Infektionshygiene der Universität Erlangen-Nürnberg)

14 Stämme:

8382 (A.c.var.anitratus)	8938 (A.c.var.anitratus)
8527 ''	9636 ''
8573 ''	9835 ''
8908 ''	9857 ''
9505 ''	2262 ''
5173 ''	5431 ''
8404 (A.c.var.lwoffii)	
9006 ''	

Acinetobacter calcoaceticus, ESSEN

(Dr. E. Rosenthal, Institut für Mikrobiologie, Essen)

10 Stämme:

R 1 (A.c.var.anitratus)	R 12 (A.c.var.anitratus)
R 51 ''	1799 ''
R 6 ''	1868 ''
R7 ''	3147 ''
R 11 ''	11120 ''

Acinetobacter calcoaceticus, JAPAN

(Dr. T. Fujitani, Institute for Fermentation, Osaka)

2 Stämme:

IFO 12552 (*A.c.var.anitratus*)

IFO 13006 ''

Acinetobacter calcoaceticus, WEINGARTEN

(Dr. H. Grimm, Institut für med. Mikrobiologie und klin. Chemie,
Labor Dr. Gärtner, Weingarten)

16 Stämme:

15792 (*A.c.var.anitratus*) 22201 (*A.c.var.anitratus*)

24731 '' 1476 ''

25411 '' 4158 ''

30208 '' 10796 ''

31517 '' 2846 ''

30893 '' 25305 ''

25387 '' 26617 ''

30437 ''

11647 (*A.c.var.lwoffii*)

Acinetobacter calcoaceticus, MÜNCHEN-GROSSHADERN

(Dr. G. Ruckdeschel, Bakteriolog. Abteilung d. Klinikum Grosshadern,
München)

12 Stämme:

36051 (*A.c.var.anitratus*) 36618 (*A.c.var.anitratus*)

7372 '' 9678 ''

14159 '' 1629 ''

40655 A '' 40655 B ''

37042 '' 40824 ''

103 (*A.c.var.lwoffii*)

109 ''

Acinetobacter calcoaceticus, USA-ROCKVILLE

(American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA)

1 Stamm:

ATCC 27225 (*A.c.var.anitratus*)

Acinetobacter calcoaceticus, MÜNCHEN

(Prof. Dr. A. Bauernfeind, Abteilung für experiment. medizinische
Mikrobiologie an dem Max von Pettenkofer-Institut, München)

4 Stämme:

20557 (*A.c.var.anitratus*) 26965 (*A.c.var.lwoffii*)

1617 ''

25384 ''

Acinetobacter calcoaceticus, HAMBURG

(Dr. Freiesleben, Allg. Krankenhaus St. Georg, Hamburg)

1 Stamm:

J 22 (*A.c.var.anitratus*)

Klebsiella, KOPENHAGEN

(Dr. F. Orskov, Statens Serum Institut, Kopenhagen)

2 Stämme:

K 1, K 61

Providencia rettgeri, JAPAN

(Dr. S. Namioka, National Institute of Animal Health, Tokyo)

2 Stämme:

J 5, J 38

II. Medien, Reagenzien

Alle Medien von: Difco-Laboratories, Detroit

Mueller-Hinton-Broth (MHB), pH 7,4
21,0 g auf 1000 ml aqua deion.

Tryptic-Soy-Broth (TSB), pH 7,3
30,0 g auf 1000 ml aqua deion.

Tryptic-Soy-Agar (TSA)
40,0 g auf 1000 ml aqua deion.

Soft-Agar (0,7%)
7 g Bacto-Agar und 21 g MHB auf 1000 ml aqua deion.

Chloroform pro analysi (Merck, Darmstadt)

Methanol pro analysi (Merck, Darmstadt)

Mitomycin C (for injection, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Tokyo)
gelöst in reinem Methanol

Saccharose zur Dichtegradientenzentrifugation
(Ribonuclease und Desoxyribonuclease nicht nachweisbar; Merck
Darmstadt)

Phosphatpuffer, 0,05 M, pH 6,8
2,43 g KH₂PO₄ + 5,609 g Na₂HPO₄ auf 1000 ml aqua deion.
2 4 2 4
(Merck, Darmstadt)

Trypsin, lyophilisiert, salzfrei (SIGMA, Taufkirchen)

III. Geräte

Photometer: Corning Colorimeter 252, Filter 600 nm
(Corning Medical GmbH, Gießen)

Inkubator für geschüttelte Flüssigkulturen:
New Brunswick Controlled Environment Incubator Shaker
(New Brunswick Scientific Co. Inc., New Brunswick N.J. USA)

Zentrifugen:

- Ultrazentrifuge TGA 50, Rotortyp SW 50.1
(Fa. KONTRON, Eching)
- Ecco-Superior IIb, Tischzentrifuge
(Fa. Beckmann, München)

Vorrichtung zum Mischen von Dichtegradienten
(H. Hölzel Technik, Dorfen)

DENLEY Multipoint Inoculator
(DENLEY-TECH, Billinghamhurst, Sussex, U.K.)

Dialysierschlauch: Visking, (SERVA, Heidelberg)

C.METHODEN

I. Bakteriozine in Flüssigkulturen

1. Bakteriozinproduktion in flüssigem Nährmedium

Sämtliche Bakteriozine waren auf festem Medium (TSA) identifiziert worden (32). Zur technisch einfacheren Charakterisierung der Bakteriozine wurde versucht, Bakteriozinproduktion auch in Flüssigkultur (TSB) zu erreichen.

a. Bakteriozinnachweis in TSB

Eine über Nacht bei 37°C bebrütete Produzervorkultur wurde in einen Seitarmkolben mit 20 ml TSB auf eine optische Dichte von 50 (= 5×10^7 Keime/ml) eingimpft. Diesem Ansatz wurden noch 0,5 µg Mitomycin C pro ml zugegeben. Die Suspension wurde in einem Schüttler bei 32°C und 150 rpm acht Stunden lang bebrütet. Während der nächsten 16 Stunden, bis zum 24-Stundenwert, unterblieb dann das Schütteln. Jeweils nach drei, fünf, sechs, sieben, acht und 24 Stunden entnahm ich eine Probe (0,5 ml), bestimmte deren optische Dichte und zentrifugierte sie anschließend 15 min. lang bei 900 Umdrehungen pro Minute. Nach dem Sedimentieren der Produzerbakterien, wurde der Überstand in ein Reagenzglas abgekippt, mit 200 µl Chloroform versetzt und kräftig geschüttelt, um noch vorhandene Keime abzutöten. Als Nachweissystem für Bakteriozine dienten 100 µl einer Indikatorbakteriensuspension (OD 50, gelöst in TSB), die mit 3 ml Softagar vermischt und über eine Agarschicht (25 ml TSA in Plastikpetrischalen von 9 cm Durchmesser) gegossen wurden. Auf den Indikatorbakterienrasen wurde nun jeweils eine Öse (ca. 2 µl) der konzentrierten 'Bakteriozinlösung', sowie aus einer 1:10 und einer 1:100 Verdünnung aufgetropft und die Platte schließlich über Nacht (ca. 16 Stunden), bei 37°C bebrütet.

Um die Hemmstoffbildung mit sämtlichen, für einen bestimmten Producer typischen Indikatoren erfassen zu können, wurden die 7-Stundenproben mit allen Indikatoren getestet. Für die übrigen Werte beschränkten wir uns auf zwei verschiedene Indikatorstämme.

Zum qualitativen Vergleich der Hemmhöfe diente folgende Bewertungsskala:

- 1 : gerade erkennbarer Hemmhof innerhalb des geschlossenen Bakterienrasens
- 2 : deutlicher Hemmhof, jedoch viele Einzelkolonien
- 3 : deutlicher Hemmhof, nur mehr vereinzelt auftretende Indikatorkolonien
- 4 : klarer Hemmhof

b. Variationen der Methode

- Lochtest

Anstelle des Auftragens der 'Bakteriozinzlösung' mit einer Platinöse, wurde ein Loch ($\varnothing$ ca. 4 mm) in den Indikatorrasen gestanzt und mit dem Kulturüberstand aufgefüllt. Dadurch erhöhte sich das Testvolumen von ca. 2 ul auf etwa 20 ul.

- Vorgezogene Chloroformbehandlung

Aufgrund der Überlegung, die Producerbakterien könnten zwar Bakteriozin bilden, dieses aber nicht an das Medium abgeben, wurde die aus dem Schüttelkolben entnommene Probe sofort mit Chloroform versetzt, geschüttelt und dann erst zentrifugiert. Auf diese Weise sollten aus den Producerkeimen bereits vor dem Zentrifugieren Bakteriozine freigesetzt werden.

- Bebrüten bei Zimmertemperatur

Um das Indikatorwachstum zu verlangsamen und schwache Hemmhöfe besser erkennen zu können, wurden die Platten nicht bei 37°C bebrütet, sondern über Nacht bei Zimmertemperatur belassen.

- Aufbringen einer unbehandelten Probe auf den Indikatorrasen

Die aus dem Schüttelkolben entnommene Probe lebender Producerbakterien wurde weder chloroformiert, noch zentrifugiert, sondern sofort auf den Indikatorrasen aufgetropft.

2. Bakteriozinproduktion in Flüssigmedien erhöhter Viskosität

Um die Wachstumsbedingungen der Producerbakterien auf Agarplatten zu simulieren, wurde die Viskosität der Nährbouillon, ausgehend von reiner TSB, schrittweise durch Agarzusatz erhöht.

Dazu wurden zunächst reiner TSB verschiedene Konzentrationen an Bactoagar zugegeben und nach Sterilisation, sowie Erkalten des Mediums, dessen Konsistenz überprüft.

Jeweils 25 ml der unterschiedlich viskösen Medien wurden mit 0,5 µg Mitomycin C /ml verrührt und in eine Kunststoffpetrischale gegossen. Dieses Gemisch wurde nun mit Producerbakterien bis auf eine optische Dichte von ca. 50 beimpft und in einen 32°C -Brutschrank gestellt. Pro Producerstamm gelangten vier verschiedene Medien zu Anwendung. Jeweils nach 8, 24 und 32 Stunden wurden 1 ml -Proben entnommen und anschließend genauso behandelt, wie die Flüssigkulturproben.

3. Bestimmung des Sedimentationsverhaltens (Saccharosegradient)

Sofern Bakteriozine in Kulturüberständen vorliegen und dabei Titer von mindestens 10^{-1} erreichen, läßt sich mit Hilfe eines Saccharosegradienten deren Sedimentierbarkeit und, bei Verwendung eines bekannten Markers die ungefähre Größe bestimmen, da die Bakteriozine innerhalb des Gradienten durch die Zentrifugation absinken und je nach Sedimentationsgeschwindigkeit in bestimmten Fraktionen nachgewiesen werden können. Die Saccharosegradienten wurden aus jeweils 2,2 ml einer 5%-igen und einer 20%-igen Saccharoselösung in 0,05 molarem Phosphatpuffer, pH 6,8 hergestellt. Mit Hilfe einer rotierenden Plexiglasschraube, die in das Gefäß mit der 20%-igen Zuckerlösung tauchte, wurden die beiden Flüssigkeiten miteinander vermischt und der so

entstehende Saccharosegradient über einen Schlauch, am Boden des Gefäßes mit der 20%-igen Zuckerlösung, in Zentrifugenröhrchen geführt. Dieser Zuckergradient wurde nun vorsichtig mit 100-200 μ l des bakteriozinhaltigen Überstandes überschichtet und anschließend 45 Min. lang bei 30000 rpm und 20°C zentrifugiert. Als Vergleichsgröße für die Bakteriozine diente ein bekanntes Phagenschwanzbakteriozin des *Providencia rettgeri* - Stammes J 5 (9), das sich immer in den dafür typischen Fraktionen des Saccharosegradienten befinden mußte. Nach der Zentrifugation wurden die Röhrchen in ein Stativ eingespannt, mit einem ölgefüllten Schlauchsystem, an dessen Ende eine Spritze angebracht war, luftdicht verschlossen und schließlich mit einer Nadel an ihrem tiefsten Punkt angestochen. Durch Drehen am Stempel der Spritze erhöhte sich der Druck im Schlauchsystem und der Saccharosegradient begann abzutropfen. Jeweils 14 Tropfen (ca. 250 μ l) wurden zu einer Fraktion gesammelt, wobei sich meistens zwischen 18 und 20 Fraktionen ergaben.

Die einzelnen Fraktionen wurden nun in konzentrierter und 1:10 Verdünnung auf das übliche Softagar-Indikatorsystem aufgetragen und zeigten durch die Ausbildung eines Hemmhofes bei einer bestimmten Fraktion die Position der Hemmsubstanz im Gradienten, relativ zu dem mitgeführten Marker, an.

4. Bakteriophagennachweis

Sollten Hemmhöfe auf den Indikatorplatten durch Bakteriophagen statt Bakteriozinen verursacht worden sein, so mußten diese auf anderen Indikatorrasen zu charakteristischen Plaques führen.

Zur Abklärung dieser Frage wurde das Agarmedium vom Bereich der Hemmhöfe mit einer Platinöse ausgestochen, in 0,5 ml TSB gelöst und mit 200 μ l Chloroform kräftig geschüttelt. Jeweils 100 μ l davon, sowie aus einer 1:10 und einer 1:100 Verdünnung wurden mit 100 μ l einer Indikatorbakteriensuspension (OD 300), sowie 3 ml Softagar vermischt und auf Agarplatten ausgegossen.

II. Bakteriozine in festem Nährmedium

1. Nachweis von Bakteriozinproduktion in TSA

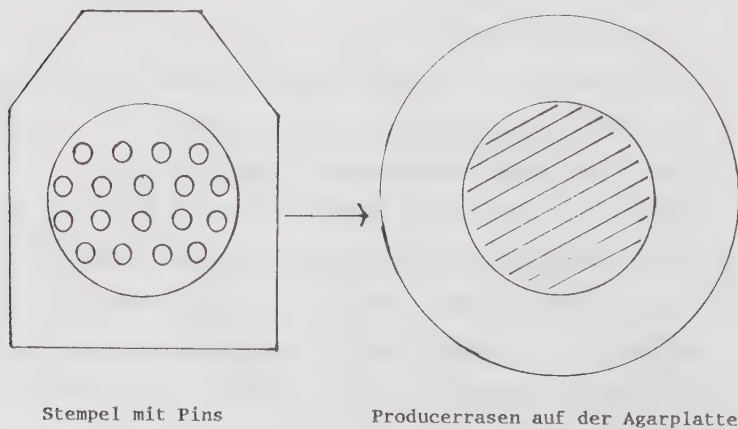
a. Die Multipoint-Inoculatormethode

Diese Methode eignet sich aufgrund ihres mechanisierten Aufbaus besonders gut zur Überprüfung größerer Stammzahlen auf Producer- bzw. Indikatoreigenschaften.

Mit Hilfe eines, mit Metallstiften ('Pins') versehenen Stempels, werden dabei Bakterienzellen aus einer Flüssigkultur auf die Oberfläche einer Agarschicht übertragen.

Zuerst werden in einer Vorkultur die Producerstämme im Schüttler bis auf eine optische Dichte von 400 hochgezüchtet und anschließend mit TSB auf 1:5 verdünnt. In diese Suspension tauchen die, in einer Kreisfläche angeordneten Pins des Pointers und übertragen Producerkeime auf eine TSA-Platte (6), der je nach Versuchsziel 0,25 ug Mitomycin C /ml und bzw. oder 50 ug Trypsin /ml zugesetzt sind. Der Durchmesser des auf der Agarschicht entstehenden, kreisförmigen Producerrasens beträgt etwa 5,5 cm.

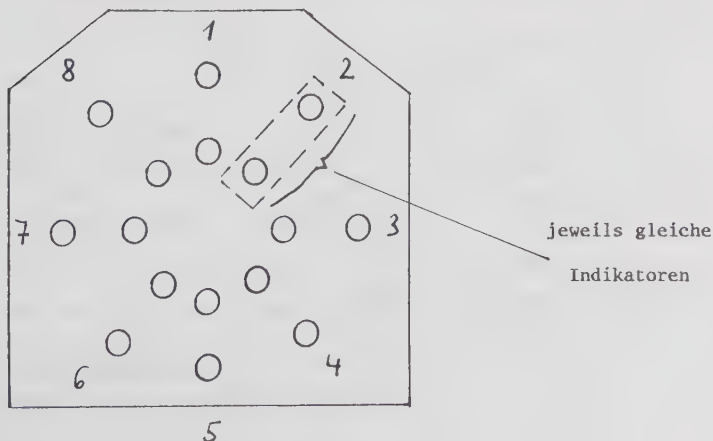
Abb. 1 : Anordnung der Beimpfungsstifte (Pins) beim Pointen der Producer



Nach 16 - stündigem Bebrüten bei 32°C, wird der Producerrasen mit Hilfe eines Objektträgers und Filterpapier entfernt. Die Agarplatten werden zum Abtöten der verbliebenen Bakterienreste umgekehrt für ca. 15 min. in Glaspetrischalen gestellt, auf deren Boden ein mit 1 ml Chloroform durchtränktes Filterpapier liegt (4).

Sollte Bakteriozin gebildet worden sein, so muß es sich innerhalb des Producerkreises befinden. Zum Nachweis werden die Indikatorstämme jeweils in 4 ml TSB auf eine optische Dichte von 65 hochgezüchtet, anschließend auf 1:500 verdünnt, in Reservoirgefäße gefüllt und wieder mit Hilfe des Multipoint-Inoculators, allerdings mit anderer Anordnung der Pins, auf die vormalige Producerplatte gebracht. Der hierzu verwendete Stempel enthält nur 16 Pins. Sie sind so angeordnet, daß jeweils acht der Pins innerhalb und die restlichen acht Metallstifte außerhalb der Producerzone auftreffen. Dabei übertragen stets zwei benachbarte Pins denselben Indikator, da sie beide in Töpfchen gleichen Inhalts tauchen. Die nach diesem Schema maximal aufzubringenden acht Indikatorstämme lassen sich also jeweils in eine Kontrolle, die außerhalb und eine Probe, die innerhalb des Producerkreises wächst, unterteilen (5).

Abb. 2 : Anordnung der Beimpfungsstifte (Pins) beim Pointen der Indikatoren.



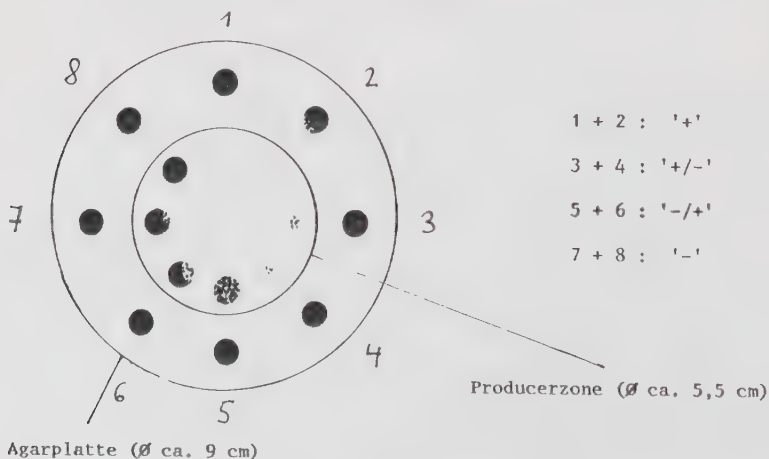
Zu beachten ist, daß die Pins nach jedem Pointvorgang durch Eintauchen in 96%-igen Alkohol und Abflammen ausgeglüht werden müssen, um eine Verschleppung des Bakteriozins auf nachfolgende Platten zu vermeiden. Die beimpften Platten werden 16 Stunden lang bei 37°C bebrütet und dann nach folgendem Schema ausgewertet (5) :

- : der Indikator wächst außen und innen gleich stark
(keine Hemmung durch ein Bakteriozin)
- /+ : das Wachstum des inneren Stammes ist gehemmt, aber weniger als 50 %
- +/- : das Wachstum des inneren Stammes ist zu mehr als 50 % gehemmt
- + : das Wachstum des inneren Stammes ist im Vergleich zur äußeren Kontrolle vollständig gehemmt
(Anwesenheit eines Hemmstoffes)

Die Bezeichnung '-/+' wird als '-' gewertet, da eine geringfügige Wachstumshemmung auf eine Erschöpfung des Mediums durch den zuvor gewachsenen Producer zurückgehen kann. Ist das Wachstum des Kontrollstammes ebenfalls teilweise gehemmt, so gilt auch hier die Bewertung '+', da die Hemmung mit einer Diffusion des Bakteriozins nach außerhalb der Producerzone erklärt werden kann.

Die nachfolgende Abbildung soll die Bewertung der möglichen Ergebnisse verdeutlichen.

Abb. 3 : Bewertung des Indikatorwachstums



b. Die Radialausstrichmethode

Bei diesem Verfahren werden die Indikatoren nicht, wie eben beschrieben, gepointet, sondern mit Hilfe eines Drahtspatels radspeichenförmig auf die Platte gebracht. Dazu wird eine Kante des Spatels in eine unverdünnte Indikatorsuspension (OD 50) getaucht und diese durch zweimaliges Hin- und Herschieben, in Form einer Linie, deren eine Hälfte in, die andere Hälfte außerhalb der Producerwachstumszone liegt, auf die Agarplatte gestrichen. Die Anordnung der Indikatoren bleibt dieselbe, infolgedessen auch hier maximal acht Indikatorstämme zur Testung gelangen (7). Der Vorteil dieser Methode liegt in einer genaueren Ablesbarkeit des Bakteriozinhemmeffektes, weshalb ich dieses Verfahren hauptsächlich bei widersprüchlichen Ergebnissen der Multi-point-Inokulatormethode als Zusatz verwendete.

2. Bakteriophagennachweis

Zum Nachweis einer Bakteriophagenproduktion auf festem Nährmedium, wurden Agarplatten von jeweils 25 ml TSA und einem Zusatz von 0,25 µg Mitomycin C /ml (nach Abkühlen des sterilisierten Agars auf ca. 50°C) verwendet.

Die Agarmedien wurden mit den jeweiligen Producerbakterien depointet, danach abgekratzt, chlorformiert und, um evtl. vorhandene Bakteriophagen innerhalb des Producerkreises auch nach außen zu verteilen, mit 100 µl NaCl überschichtet. Die Kochsalzlösung wurde dazu gleichmäßig über die gesamte Oberfläche des Mediums ausgespatelt. Die so präparierte Agarplatte wurde schließlich mit 100 µl einer Indikatorbakteriensuspension (OD 50), in 3 ml Softagar, überschichtet und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Der Bakteriophagenausschluß wurde auch durch Ausstechen kleiner Agarstückchen aus dem Areal vorausgegangenem Producerwachstums geführt, wobei diese so behandelt wurden, wie bereits für den Phagennachweis bei Flüssigkulturen beschrieben (S.13).

3. Verfahren zur Charakterisierung der Bakteriozine

a. Temperaturstabilität der Bakteriozine

Um die Temperaturempfindlichkeit der einzelnen Bakteriozine zu bestimmen, wurden zunächst acht Agarplatten (25 ml TSA + 0,25 µg Mito-mycin C /ml) mit demselben Producer bepointet. Nach Wachstum und Entfernen des Bakterienrasens, wurden sieben dieser Platten jeweils 30 min. lang, in einem Wasserbad, folgenden Temperaturen ausgesetzt:

45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C und 80°C.

Die achte Agarplatte verblieb als Kontrolle für eine sichere Bakteriozinbildung des Producers bei Zimmertemperatur. Nach Abkühlen des Mediums, wurden die Platten mit den zugehörigen Indikatoren bepointet und nach 16 - stündigem Bebrüten bei 37°C ausgewertet, wobei jede Bewertung mit '-' einem Aktivitätsverlust des Bakteriozins entsprach. Für höhere Temperaturen war eine Abänderung der Versuchsmethode erforderlich, da die verwendeten Kunststoffpetrischalen ab einer Temperatur von etwa 85 - 90°C stark deformiert werden und sich der Agar ab ca. 85°C vollständig verflüssigt. Dadurch verteilt sich das darin enthaltene Bakteriozin gleichmäßig im ganzen Nährmedium und macht eine Außenkontrolle des Indikatorwachstums unmöglich. Um nun dieses Problem zu umgehen, wurde, nach Producerwachstum und -entfernung, die gesamte Producerzone ausgestochen, in ein Glaskölbchen gegeben und in diesem wieder jeweils 30 min. lang den einzelnen Temperaturen ausgesetzt:

90°C und 100°C im Wasserbad

110°C und 120°C im Autoklaven.

Der nach dem Erhitzen noch flüssige Agar wurde sodann wieder in den ausgestanzten Bereich der Platte zurückgegossen und nach dem Erkalten wie üblich mit empfindlichen Indikatoren bepointet.

Zum Ausschluß einer Verschlechterung der Wachstumsbedingungen für die Indikatoren durch das erneute Erhitzen des Mediums diente eine Agarplatte, die ebenfalls der jeweiligen Temperatur ausgesetzt worden war, ohne jedoch vorher mit Producer beimpft worden zu sein, sowie das Aufbringen eines unempfindlichen Indikators in der Mitte der erhitzten Producerplatten.

b. Trypsinbehandlung

Das Grundmedium dieser Versuchsreihe, 25 ml TSA, wurde jeweils nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C mit 0,25 ug Mitomycin C bzw. 50 ug Trypsin pro ml versetzt. Um eine eventuelle Wechselwirkung zwischen Mitomycin C und der Protease erkennen zu können, wurde dabei jeder einzelne Producer auf vier verschiedenen Kombinationen der genannten Medienanteile (TSA, Mitomycin C, Trypsin) überprüft:

- 25 ml TSA
- 25 ml TSA + 0,25 ug /ml Mitomycin C
- 25 ml TSA + 0,25 ug /ml Mitomycin C + 50 ug /ml Trypsin
- 25 ml TSA + 50 ug /ml Trypsin

Als Positivkontrolle, d.h. als Beweis für die Wirksamkeit des Trypsins, diente das, als Eiweiß bekannte Bakteriozin eines Klebsiella-Stammes (K 1) (5), das auf allen Platten mit Trypsinzusatz seine Aktivität verlieren sollte. Eine Negativkontrolle, die eine unspezifische Zerstörung der Bakteriozine ausschließen sollte, lieferte der bereits erwähnte *Providencia rettgeri* -Stamm J 5, dessen Bakteriozin, ein Phagenschwanz (9), durch Trypsin nicht angegriffen werden durfte.

c. Bestimmung der relativen Bakteriozingröße

- Diffusionstest mit Producereinzelskolonien

Vorkulturen von Producerstämmen wurden bis auf eine optische Dichte von 100 (= 8 Keime /ml) hochgezüchtet und anschließend in mehreren Schritten so weit verdünnt, daß nach dem Ausspateln von 100 µl dieser Suspension auf TSA -Platten mit 0,25 µg/ml Mitomycin C -Zusatz und 16 - stündigem Bebrüten bei 32°C etwa 10 Einzelskolonien zu erwarten waren. Diese Einzelskolonien wurden nun nicht entfernt, sondern lediglich chloroformiert, um ein Weiterwachsen zu verhindern, die gesamte Plattenoberfläche mit dem bereits beschriebenen Softagar-Indikatorsystem (100 µl Indikatorbakteriensuspension OD 50 + 3 ml Softagar) übergossen und ca. 16 Stunden bei 37°C bebrütet.

Je nach Größe und somit Diffusionsfähigkeit der einzelnen Bakteriozine, sollten sich nun unterschiedlich große, kreisförmige Hemmhöfe um die Einzelskolonien ausbilden.

- Diffusionstest mit Producerrasen

Im Gegensatz zu dem eben beschriebenen Diffusionstest wurden die Producerstämmen nun nicht als Einzelskolonien auf die Platte gebracht, sondern wie üblich gepointet und nach dem Wachstum entfernt. Das Überschichtungsprinzip mit Softagar blieb unverändert.

- Dialyse des Produceragars gegen NaCl

Der gesamte bakteriozinhaltige Agar der Producerwachstumszone wurde gegen physiologische Kochsalzlösung (0,9 %) dialysiert. Die Durchlässigkeit der dabei verwendeten Dialysierschläuche ist entsprechend der Porengröße von 1,5 - 2,0 nm auf eine Molekülgröße von 15.000 D beschränkt, weshalb alle größeren Moleküle im Agar zurückgehalten werden.

Die gesamte Producerwachstumszone wurde nach Entfernen des Bakterienrasens mit einem Spatel ausgestochen, in kleinen Glaskölbchen verflüssigt und in die Dialysierschläuche gegossen. Die an beiden Enden möglichst luftdicht verknoteten Schläuche wurden dann zwei Tage lang bei 4°C in etwa vier Liter 0,9%-iger NaCl-Lösung, die nach 24 Stunden erneuert wurde, dialysiert. Anschließend wurde der Inhalt des Dialysierschlauches unter Zugabe von ca. 0,2 g TSB-Pulver, um die durch Dialyse verlorengegangenen Nährstoffe zu ersetzen, erneut verflüssigt, in die ausgestanzten Areale der bei 4°C aufbewahrten Platten zurückgegossen und nach Erstarren des Agars mit empfindlichen Indikatoren bepointet. Als Kontrollen fungierten eine bakteriozinhaltige Agarplatte, die ebenfalls zwei Tage lang bei 4°C aufbewahrt worden war und die unveränderte Wirksamkeit des Bakteriozins demonstrieren sollte, sowie eine unbeimpfte TSA-Platte, die sämtliche Dialyseschritte mit durchlaufen hatte, um sicherzustellen, daß auf dem Endzustand der ausgestochenen Agarfläche überhaupt noch Bakterienwachstum möglich war.

- Prüfung der Zellophandurchgängigkeit

Eine einfachere Methode zur ungefähren Größenbestimmung von Bakteriozinen liegt in der Überprüfung dieser Hemmsubstanzen auf ihre Zellophandurchgängigkeit. Als Zellophanfläche diente ein halbiertes Dialyseschlauch, dessen Durchlässigkeitsgrenzwert bei 15.000 D liegt. Eine Agarplattenoberfläche (25 ml TSA + 0,25 µg/ml Mitomycin C) wurde in zwei Teile unterteilt, wobei die eine Hälfte unbehandelt blieb, während die andere mit einer ca. 2 x 3 cm großen Zellophanschicht bedeckt wurde (vgl. Fotos im Ergebnisteil). Auf beiden Seiten, genau gegenüberliegend, wurde nun mit Hilfe einer Platinöse ein Tropfen einer Productervorkultur (OD 300) aufgebracht. Auf diese Weise ließen sich maximal drei verschiedene Producer pro Platte untersuchen, wobei

dann jeweils eine Bakterienkultur auf der normalen Agaroberfläche (= Kontrollseite) und eine zweite Bakterienkultur desselben Producerstammes gegenüber auf der Zellophanfläche heranwuchs.

War das bei der anschließenden 16-stündigen Bebrütung bei 32°C gebildete Bakteriozin nun kleiner als 15.000 D, so konnte es durch das Zellophan diffundieren und genau wie auf der gegenüberliegenden Seite, nach Abziehen der Zellophanschicht und Überschichtung mit dem Softagar-Indikatorsystem, einen deutlichen Hemmhof in dem sonst geschlossenen Bakterienrasen erzeugen.

Die Platten wurden in diesem Versuch nur 2 -3 Stunden bebrütet und dann bei Zimmertemperatur belassen. Jeder einzelne Producer wurde mit verschiedenen Indikatoren getestet, um unterschiedliche Bakteriozine desselben Producerstammes auszuschließen. Als Kontrollbakteriozine fungierten die von Providencia rettgeri -Stamm J 5, sowie von Klebsiella -Stamm K 1.

D. ERGEBNISSE

I. Bakteriozine in Flüssigkulturen

1. Bakteriozinproduktion in flüssigem Nährmedium

a. Eigenheiten der Bakteriozinbildung bzw. -wirkung

Unter den 27 Stämmen, die auf Agarmedium Bakteriozine synthetisierten, erzeugten nur die Kulturüberstände von vier Producerstämmen (14,8%) einen deutlichen Hemmeffekt auf den jeweiligen Indikatorrasen und zwar nicht bei sämtlichen, in Festkultur ermittelten Indikatorstämmen, sondern bei nur einem bzw. zwei dieser Stämme (Tabelle 1).

Tab. 1 : Bakteriozine in Kulturüberständen

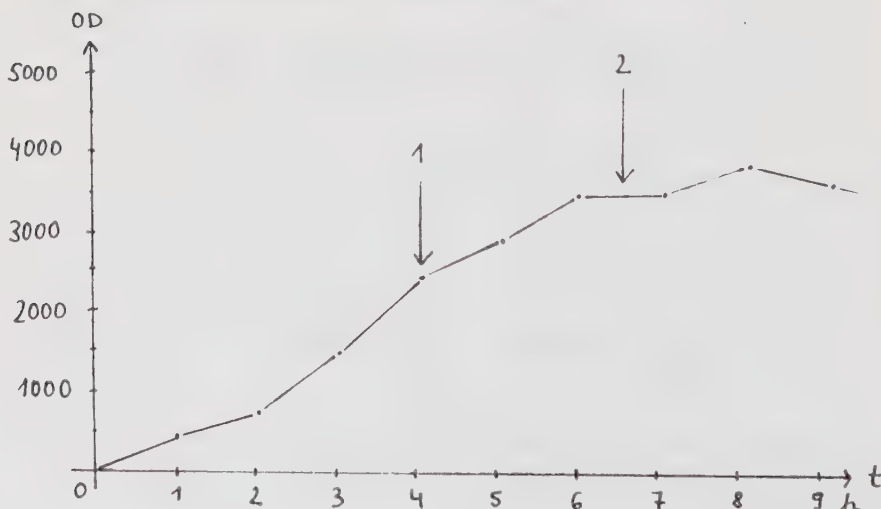
Producer	Indikatoren bei festem Medium (32)	Indikatoren bei Kulturüberständen
1617	20557, 25384, 26617, 9857, 30893, 14159, 3147, IFO 13006, 11120	26617, 14159
J 22	20557, 25384, 11120, 9857, 3147, 15792	15792
36618	20557, 25384, 26617, 9857, 3147, 15792, 14159	20557, 15792
30208	20557, 25348, 26617, 9857, 11120, 14159	20557

Die höchste Verdünnungsstufe des Kulturüberstandes, bei der noch ein Hemmhof erkennbar war, lag bei 10^{-2} . Dieser Titer schwankte bei Wiederholungsversuchen und ging manchmal bis auf nur mehr schwache Hemmhöfe bei konzentriertem Überstand zurück.

Allen 'Flüssig-Productern' gemeinsam, war ein erstmaliger Nachweis einer Bakteriozinproduktion in der mittleren log-Phase (nach drei bis vier Stunden); der höchste der Bakteriozintiter ließ sich am Ende der log-Phase, am Übergang zur stationären Wachstumsphase, nach ca. sieben Stunden ermitteln.

Der Durchmesser der Hemmhöfe lag, entsprechend der zum Auftropfen verwendeten Platinöse, bei etwa 0,5 cm., ihr Rand war scharf begrenzt, oder gezackt. Die Hemmhöfe erschienen je nach Verdünnungsstufe völlig klar (bei konzentriertem Überstand = Bewertungsstufe 4), oder mit vereinzelt (3), bzw. zahlreichen (2) Indikatorcolonien durchwachsen, bis zu einem nur mehr angedeuteten Hemmhof (1) innerhalb des geschlossenen Indikatorrasens.

Die folgenden Darstellungen veranschaulichen diese Ergebnisse am Beispiel des Producers 30208 (Indikator: 20557)



1: Erstmalig Bakteriozin nachweisbar

2: Maximum der Bakteriozinproduktion

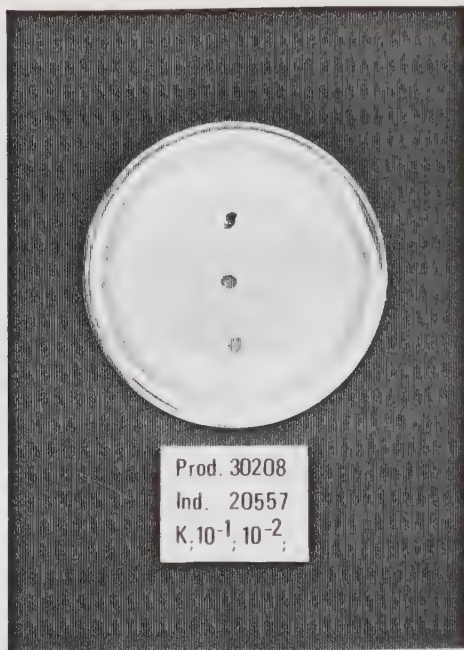
Abb. 4 : Producerwachstum und Bakteriozinproduktion

Tab. 2 : Kinetik der Bakteriozinbildung

Bebrütungszeit des Producers (Stunden)	Bakteriozintiter und Art der Hemmhöfe		
	K	-1 10	-2 10
2 und 3	-	-	-
4	2	1	-
5	3	2	1
6	4	3	2
7	4	3	2
8	3	2	1
9	2	1	-
24	4	3	2

(Producer 30208, Indikator 20557)

Abb. 5 : Hemmhöfe des Producers 30208 auf Indikatorrasen 20557
(7-Stunden-Wert)



Bei einem der Producer (J 22), der im Maximum seiner Bakteriozin-
produktion (nach 8 Stunden) einen Titer von 10^{-1} , mit einem Hemm-
hof der Stufe 3 erreichte, zeigten sich bei der 100-fachen Verdünnung
des Kulturüberstandes vereinzelte Hemmeffekte, die an Phagenplaques
erinnerten, statt des üblichen Hemmhofes.

b. Hemmhofbildung durch Producerkolonien

Alle Versuche, die zu einer Flüssigproduktion der bisher 'negativen'
Producer führen sollten, blieben ohne Erfolg.

Wurde dagegen Material aus einer unbehandelten Producerkultur mit ei-
ner Öse auf den Indikatorrasen gebracht, so bildete sich um die he-
rangewachsenen Producerkolonien ein deutlicher Hemmhof, während das
Auftropfen einer wie üblich behandelten Probe desselben Kulturüber-

standes keine Wachstumshemmung der Indikatorbakterien nach sich zog. Damit war der Beweis für eine nur auf festem Nährmedium stattfindende Bakteriozinproduktion der in Flüssigkultur 'negativen' Produckerkeime erbracht.

c. Stabilität der Bakteriozine

Ein erneutes Titrieren der vier, eine Woche lang bei 4°C aufbewahrten, bakteriozinhaltigen Kulturüberstände im Softagar-Indikatorsystem ergab keine wesentliche Änderung der Aktivität und somit keinen Hinweis auf besondere Instabilität dieser Hemmsubstanzen.

2. Bakteriozinproduktion in Flüssigmedien erhöhter Viskosität

a. Bacto-Agarzusatz und Konsistenz des Nährmediums

Die Vermischung reiner TSB mit zunehmenden Volumenprozentanteilen an Bacto-Agar führt zu ansteigender Viskosität des Nährmediums, die, angefangen mit flüssiger TSB, bei festem Agar endet.

Tab. 3 : Zusammensetzung und Konsistenz von 'Übergangsmedien'

	T S B + (3 g ad 100 ml aqua deion.)	Bacto-Agarzusatz (Vol.%)	Konsistenz des Mediums
		0	flüssig
		0,1	dickflüssige TSB
		0,2	Übergang zu Gel
		0,3	Gel
		0,4	weicher Agar
		ab 0,5	verfestigter Agar

b. Verhalten der einzelnen Producer

Auch bei diesen, dem festen Medium angenäherten Wachstumsbedingungen, konnte keine Bakteriozinproduktion der schon in Flüssigkultur 'negativen' Producerstämme nachgewiesen werden.

Ein bereits bekannter Flüssigproducer, 30208, erzeugte dagegen nach einer Wachstumszeit von 24 Stunden deutliche Hemmhöfe. Die Bakteriozinproduktion nahm jedoch mit zunehmender Viskosität des Mediums ab (bei gleicher Inkubationsdauer), obwohl das Bakterienwachstum deutlich stärker war, wie folgende Übersicht zeigt.

Tab. 4 : Bakteriozinproduktion in Abhängigkeit von der Konsistenz des Nährmediums

32-Stunden-Wert : Producer 30208 (Ind.20557)

Bacto-Agarzusatz (Vol.%)	Bakteriozintiter und Art der Hemmhöfe	
	Konzentriert	-1 10
0	3	1
0,05	2 - 3	1
0,1	2	-
0,15	1	-

3. Bestimmung des Sedimentationsverhaltens (Lage des Peaks im Saccharosegradienten)

Das Sedimentationsverhalten des in Flüssigkultur produzierten Bakteriozins im Saccharosegradienten wurde zunächst für den Producerstamm 30208 (Indikator 20557) bestimmt, da dieser Stamm relativ konstant einen Aktivitätstiter von 10^{-2} zeigte, während die übrigen drei Flüssigproducer, trotz mehrfacher Versuche, den notwendigen Titer von reichlich 10^{-1} nicht erreichten. Zentrifugate von Saccharosegradienten, die jeweils 45 min. lang bei 30.000 rpm zentrifugiert worden waren, ergaben Hemmhöfe in den untersten drei, also schwersten Fraktionen, mit einem maximalen Hemmeffekt ('Peak') bei Fraktion 3. Durch verschärfte Zentrifugation, d.h. jeweils zwei und vier Stunden lang bei 30.000 rpm, wurde die Aktivität auf einen Peak in Fraktion 2 gedrängt. Das Auftropfen dieser Fraktionen auf Indikatorsysteme mit trypsinhaltigen Agar (25 ml TSA + 50 µg Trypsin /ml) erzeugte nach wie vor eindeutige Hemmhöfe, was auf eine Trypsinresistenz der Hemmsubstanzen hindeutet. Diese Tatsache und das im Saccharosegradienten deutlich gewordene, weit über dem des Markers J 5 liegende Molekulargewicht dieser Bakteriozine, führte schließlich zu der Annahme von intakten Bakteriophagen.

4. Nachweis und Charakterisierung von Bakteriophagen

Der Verdacht, bei den auch in Flüssigkultur synthetisierten Hemmsubstanzen handle es sich nicht um die eigentlichen Bakteriozine des festen Mediums, sondern um Bakteriophagen, wurde nun durch diesen Versuch bestätigt. Alle bakteriozinhaltigen Überstände der vier Flüssigproducer führten zur Ausbildung von Phagenplaques innerhalb des jeweiligen Indikatorrasens, die durch ihr unterschiedliches, producerspezifisches Aussehen zu differenzieren waren.

Tab. 5 : Differenzierung der Bakteriophagen anhand ihrer Plaques

Producer	Lysegrad	Durchmesser d. Plaques
J 22	klar	1 mm
1617	leicht getrübt	1,2 mm
36618	trüb	1 mm
30208	trüb	1,5 mm

Abb. 6 : Bakteriophagenplaques: Prod. 30208, Ind. 20557
(1:10 - Verdünnung des Kulturüberstandes)



II. Bakteriozine in festem Nährmedium

1. Bakteriophagenausschluß

Mit keiner der beiden beschriebenen Methoden konnten Phagenplaques nachgewiesen werden, was dafür spricht, daß Bakteriophagen primär in Flüssigkultur freigesetzt werden, während die eigentliche Bakteriozinproduktion nur in festem Medium erfolgt.

2. Qualitative Unterscheidung einzelner Indikatoren

Überschichtungen der gesamten Producerwachstumsfläche mit dem Softagar-Indikatorsystem, wie sie zum Nachweis von Bakteriophagen angewandt wurde, ermöglichte zugleich eine qualitative Bewertung einzelner Indikatoren. So wirkte z.B. die Producerfläche nach Überschichtung mit einem gut empfindlichen Indikatorkeim wie ausgestanzt, oder wies nur mehr vereinzelt Indikatorkolonien auf, während andere Indikatoren desselben Producers nur zu einer Aufhellung des Bakterienrasens in diesem Bereich führten.

Tab.6 gibt die jeweils besten Indikatoren der verschiedenen Producer wieder.

Tab. 6 : Optimale Indikatoren für vier Producerstämme

Producer	Indikatoren
J 22	20557, 25384, 15792
1617	26617, 25384
36618	26617, 25384, 14159
30208	26617, 14159

3. Eigenschaften der Bakteriozine

a. Temperaturstabilität

- Bakteriozinspezifische Unterteilung der Producer

Aufgrund der systematischen Überprüfung der Hemmaktivität jedes einzelnen Bakteriozins bei Temperaturen von 45°C bis 80°C ließen sich zwei große Gruppen von Producern unterscheiden. Eine Gruppe beinhaltet Producerstämme, die thermolabile Bakteriozine bilden, welche bereits bei 30-minütigem Erwärmen auf 50°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) keine nachweisbare Aktivität mehr besitzen. Die andere Gruppe besteht dagegen aus Producern, deren Bakteriozine auch bei Erhitzen auf 80°C keinen ersichtlichen Aktivitätsverlust zeigen.

Ein Producer (2846) ließ sich anfänglich in keine der genannten Gruppen einordnen, da er innerhalb seiner 26 verschiedenen Indikatoren große Unterschiede bzgl. des Temperaturverhaltens seines Bakteriozins aufwies. In fünf voneinander unabhängigen Versuchen wurden 13 (50%) seiner Indikatoren bereits nach 30 min. bei 50°C nicht mehr gehemmt, während bei drei (11,5%) auch nach 80°C ein deutlich geschwächtes Wachstum gegenüber den Kontrollstämmen zu verzeichnen war. Für die restlichen zehn Indikatoren (38,5%) ergaben sich unterschiedliche Resultate.

Von den 27 überprüften Producern gehören demnach 17 Producer (63%) der 'thermolabilen' und 10 Producer (37%) der 'thermostabilen' Gruppe an. (Siehe Tab.8) Zum Vergleich der Temperaturempfindlichkeiten von Bakteriozinen wurden auch der Klebsiella-Stamm K 1 (Ind. K 61), sowie der Providencia rettgeri-Stamm J 5 (Ind. J 38) in die Versuche mit einbezogen. Dabei verlor das niedermolekulare Bakteriozin von K 1 nach 30 min. bei 50°C seine Hemmfähigkeit; das Phagenschwanzbakteriozin von J 5 war bei 65°C teilweise und ab 70°C vollständig inaktiviert.

- Optimierung der Methode

Bei einigen der Producer, die ein thermolabiles Bakteriozin an das Medium abgaben, zeigten sich innerhalb ihrer Indikatoren Unterschiede bzgl. der Inaktivierungstemperatur. So wurde z.B. ein Indikator ab einer bestimmten Temperatur nicht mehr gehemmt, während ein anderer Indikatorstamm erst bei einer um ca. 5°C erhöhten Temperatur ungehemmt zu wachsen schien. Zur weiteren Analyse dieses Phänomens wurden diese Producer noch einmal überprüft; diesesmal nur mit den fraglichen Indikatoren und den zwei, bzw. drei sich überschneidenden Temperaturen, die dann auch nicht 30 Minuten lang, sondern jeweils für 10, 20 und 30 Minuten auf den bakteriozinhaltigen Agar einwirkten. Diese genauere Temperaturverhaltensstudie einzelner thermolabiler Bakteriozine bot die Möglichkeit, die Qualität der jeweiligen Indikatoren eines bestimmten Producers darzustellen. So sind z.B. schwächere, bzw. unempfindlichere Indikatoren, die nur von einer relativ hohen und intakten Bakteriozinmenge gehemmt werden, sehr genau von guten Indikatoren abzusondern, deren Wachstum bereits durch eine geringe Menge an eventuell auch teilinaktiviertem Bakteriozin, wie es bei höheren Temperaturen vorliegen dürfte, behindert wird.

Die im folgenden Schema festgehaltenen Versuchsergebnisse lassen diese Unterschiede gut erkennen; der Umschlag von '+' bzw. '+/-' nach '-' liegt bei den für das jeweilige Bakteriozin empfindlicheren Indikatoren in höheren Temperaturen, bzw. längeren Zeitintervallen der Hitzeinwirkung, als bei unempfindlicheren Indikatorstämmen. (Tab.7)

Nachdem verschiedene Producer Bakteriozine aufwiesen, die auch nach 30 min. bei 80°C keinen ersichtlichen Aktivitätsverlust zeigten, erschien es notwendig, die Temperatur noch weiter zu steigern. Mit der beschriebenen Abänderung des Versuchsaufbaus ließen sich Temperaturen bis zu 120°C erreichen; neben der Pointermethode gelangte hierbei auch die Radialmethode zur Anwendung, um eine Hemmung des Indikatorwachstums noch besser erkennen zu können.

Die bei 80°C stabilen Bakteriozine wurden nun auch durch höhere Temperaturen nicht zerstört; selbst ein 30-minütiges Erhitzen auf 120°C überstanden sie ohne sichtbaren Aktivitätsverlust. Die Indikatorstämme wurden nach wie vor in ihrem Wachstum gehemmt, was sowohl mit Hilfe der Pointermethode, als auch der Radialmethode nachgewiesen wurde. Besonders letztere verdeutlichte die erhaltene Wirksamkeit des Bakteriozins durch einen Abbruch der Indikatorlinie am Übergang zur Producerzone. Alle diese Hemmeffekte sind nicht auf eine eventuelle Erschöpfung des Mediums durch das starke Erhitzen zurückzuführen, was zum einen ein normales Wachstum der Indikatorbakterien auf der ebenfalls erhitzten Kontrollplatte, zum anderen das Wachstum eines für das jeweilige Bakteriozin unempfindlichen Indikators in der Mitte des 'gekochten' Produceragars bewies.

Das Bakteriozin des Producerstammes 2846, das bzgl. einiger Indikatorstämme auch als thermostabil anzusehen war, wurde bei einer Temperatur von 100°C weitgehend und bei 110°C vollständig inaktiviert.

Tab.8 unterteilt sämtliche Producer in zwei Gruppen bzgl. ihrer thermostabilen bzw. thermolabilen Bakteriozine und gibt jeweils die Temperatur an, die nach 30-minütiger Einwirkung ein ungehemmtes Durchwachsen der verschiedenen Indikatoren bewirkte.

Tab. 8 : Klassifizierung der Bakteriozine nach thermischer Stabilität

THERMOLABILE BAKTERIOZINE (17 Prod. = 63%)			THERMOSTABILE BAKTERIOZINE (10 Prod. = 37%)		
Producer (32)	Indikator (32)	Inaktiv. Temp. (°C)	Producer (32)	Indikator (32)	Inaktiv. Temp. (°C)
R1 (R51, R6, R7, R11)	R12, 20557, 25384, 9857, 15792, 26617, 30893, 31517, 1629, 3147 11120	55 °C	36051	8404, 9006, 9857, 103, 109, 9678 IFO 13006	> 120 °C
			40655 A	9006	> 120 °C
R12	IFO 12552	50 °C	40655 B	9006, 103, 109, 9678	> 120 °C
26965	14159 26617, 7372 R12	50 °C 45 °C	9505	9006, 103, 109, 9678, 8404, IFO 13006	> 120 °C
1617	20557, 9857 25384, 26617 30893, 14159 3147, 11120 IFO 13006	50 °C	37042	9006, 8404, 9857	> 120 °C
9636	20557, 9857 26617, 11120	50 °C	1868	9006, 8404 9857, 103 109, 9678	> 120 °C
IFO 12552	9857	45 °C	5431	9006, 103, 109, 9678, 8404 IFO 13006 9857	> 120 °C
11647	IFO 12552	50 °C	5173	9006, 103, 109, 9678, 8404, IFO 13006, 9857	> 120 °C
15792	25384	45 °C			
4158	14159	45 °C	2262	9006, 103, 109, 9678, 8404, IFO 13006 9857	> 120 °C
25305	20557, 25384 9857, 26617 14159, 11120	50 °C			

(*) nach 30-minütiger Einwirkung

THERMOLABILE BAKTERIOZINE
(17 Prod. = 63%)

THERMOSTABILE BAKTERIOZINE
(10 Prod. = 37%)

Producer (32)	Indikator (32)	Inaktiv. Temp. (°C)	Producer (32)	Indikator (32)	Inaktiv. Temp. (°C)
25387	20557, 25384 9857, 26617 14159, 11120	50 °C	2846	24731, 40655B 1629, 1868, 1476, 8382, 8908, 30208, 40655A, 4158, 26965, 8527, 37042	50 °C
26617	25384, 9857 11120	45 °C		9835, 22201 20557, R1, 9636, 9857 3147, 7372, 40824, 1617	50 - 110 °C
30208	20557, 9857 26617, 14159 11120, 25384	50 °C		11120, 14159 25384	110 °C
30893	15792, 26617 IFO 12552, 1617, 9636 26965, 11647 4158, 25305 25387, 40824 30208, R1	45 °C 50 °C			
36618	20557, 25384 9857, 15792 26617, 14159 3147	50 °C			
ATCC 27225	20557, 25384 9857, 15792, 26617, 3147 40824, 11120 14159 IFO 13006	50 °C			
J 22	9857, 11120, 3147, 15792 20557, 25384	50 °C			

(*) nach 30-minütiger Einwirkung

b. Trypsinempfindlichkeit

Innerhalb der 27 Producerstämme erwiesen sich 18 (66,7%) als Producer trypsinempfindlicher Bakteriozine, d.h. deren Aktivität wurde durch das in den Nährböden enthaltene Trypsin zerstört. Die bereits als thermoresistent charakterisierten Bakteriozine von neun Acinetobacter-Stämmen (33,3%) zeichneten sich auch durch Trypsinresistenz aus.

(Siehe Tab.9) Im Gegensatz zu den Temperaturversuchsreihen reagierten in diesem Falle sämtliche Indikatoren eines Producers stets gleichsinnig, d.h. sie wurden entweder alle durch das intakte Bakteriozin gehemmt, oder zeigten ohne Ausnahme dasselbe Wachstum wie der zugehörige Kontrollstamm bei trypsinempfindlichem Bakteriozin. Eine Beeinflussung der Trypsinwirkung durch Mitomycin C konnte aufgrund der völlig gleichartigen Ergebnisse innerhalb der einzelnen Kombinationen, und eine unspezifische Zerstörung der Bakteriozine durch die unveränderte Hemmwirkung des Kontrollstammes J 5 auf seine Indikatoren ausgeschlossen werden. Dementsprechend gewährleistete das stets unbeeinträchtigte Wachstum der Indikatoren des Kontrollstammes K 1 auf Trypsinplatten innerhalb der Producerzone die Inaktivierung des gebildeten Bakteriozins und somit die Wirksamkeit der Protease.

Interessant scheint auch die Beobachtung, daß das Bakteriozin der in Flüssigkultur als Phagenproducer ermittelten Stämme eindeutig Trypsinempfindlichkeit zeigte, was erneut gegen eine Bakteriophagenproduktion in festem Medium spricht und das in TSA freigesetzte Bakteriozin deutlich von proteaseresistenten Bakteriophagen abhebt.

Zum Ausschluß einer möglichen Trypsininaktivierung durch den Producer selbst wurde, nach dem Bepointen von Trypsinplatten mit den betreffenden Producern, nicht wie bisher die empfindlichen Indikatoren, sondern ein zusätzlicher Producer, der Klebsiella-Stamm K 1 gepointet. Hätte nun der zuerst aufgebrauchte Producer eine, die Trypsinwirkung inaktivierende, dem eigenen Bakteriozin gegenüber jedoch unwirksame

Substanz gebildet, so dürfte das anschließend entstehende trypsin-empfindliche Eiweißbakteriozin des Klebsiella-Stammes nicht mehr zerstört werden und könnte somit das Wachstum der für diese Hemmsubstanz sensitiven Indikatoren verhindern. Ein gleichermaßen starkes Wachstum der Klebsiella-Indikatoren sowohl in der inneren Producer-, als auch der äußeren Kontrollzone bewies die Wirksamkeit des Trypsins und sprach gegen das Vorhandensein eines Inaktivators. Damit konnten die jeweiligen Bakteriozine eindeutig als trypsinlabil bzw. -stabil klassifiziert werden.

Tab.9 unterscheidet Producer trypsinresistenter von denen trypsinempfindlicher Bakteriozine. Die jeweils zugehörigen Indikatoren sind Tab.8 zu entnehmen.

Tab. 9 : Producer trypsinresistenter bzw. trypsinempfindlicher Bakteriozine

Prod. trypsinempf. Bakt. 18 Stämme (66,7%)	Prod. trypsinresist. Bakt. 9 Stämme (33,3%)
R 1 (R 5I, R 6, R 7, R 11)	36051, 40655 A, 40655 B,
R 12, 26965, 1617, 9636,	9505, 1868, 37042, 5431,
IFO 12552, 11647, 15792,	5173, 2262
4158, 25305, 25387, 26617,	
30208, 30893, ATCC 27225,	
J 22, 2846	

c. Relative Größe der Bakteriozine

- Bakteriozindiffusion um Producereinzelnkolonien

Die um die Einzelkolonien des jeweiligen Producers auftretenden Hemmhöfe erreichten deutlich verschieden große Durchmesser. So betrug z.B. der Hemmhofdurchmesser des Producerstammes 9505 (Ind.9006) ca. 2 mm, während der Producer 30893 (Ind.R 1) einen Hemmhofdurchmesser von ca. 3 mm aufwies.

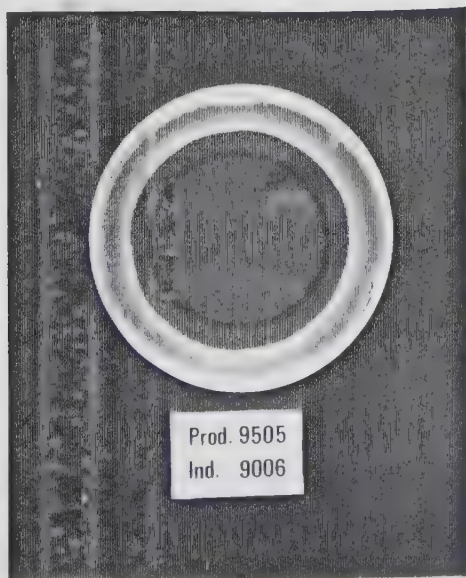
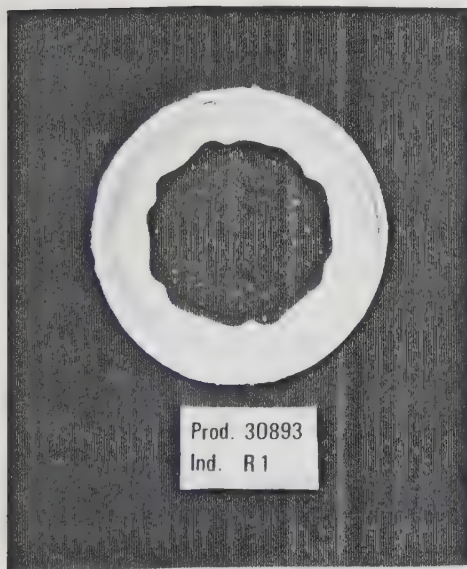
-Bakteriozindiffusion um den Producerrasen

Die Ergebnisse dieses Versuches bestätigten die hohen Diffusionsfähigkeiten der zugleich thermo- und trypsinresistenten Bakteriozine.

Wie auf den Abbildungen 7 und 8 ersichtlich, reichte der Hemmhof des Producers 9505 (Ind.9006) deutlich über die, durch eine schwarze Linie gekennzeichnete, Producerwachstumszone hinaus, während der Hemmhof des Producers 30893 (Ind.R 1) etwa diesem Areal entsprach; die jeweiligen Hemmhofdurchmesser betrugen 6,3 cm, bzw. 5,5 cm.

Zusätzlich zu den beiden Vertretern der thermolabilen, bzw. thermostabilen Producergruppe, 30893 und 9505, war auch der Producer 2846 (Ind. 25384) dieser Art des Diffusionstestes unterzogen worden. Der hierbei entstandene Hemmhof erreichte einen Durchmesser von 5,8 cm und lag somit zwischen den beiden anderen Maßen.

Abb. 7 und 8 : Differenzierung der Bakteriozine nach ihrer
Diffusionsfähigkeit



- Dialysierbarkeit der Bakteriozine

Sowohl das Bepointen der vorher dialysierten Producerwachstumszone mit sensitiven Indikatoren, als auch die zusätzlich angewandte Radialausstrichmethode führte zu denselben Resultaten. Nach erfolgter Dialyse ließ sich keine Hemmung des Indikatorwachstums mehr feststellen. Dies kann nicht auf einen Aktivitätsverlust der Bakteriozine zurückgeführt werden; Bakteriozine auf im Kühlschrank aufbewahrten Kontrollplatten waren auch nach zwei Tagen noch wirksam. Diese Bakteriozine mußten also kleiner sein, als 15.000 D und waren durch die Dialyse gegen physiologische Kochsalzlösung aus dem Agar entfernt worden.

- Zellophandurchgängigkeit

Mit Hilfe dieser Methode konnte die relative Größe der Bakteriozine aller 27 Producerstämme bestimmt werden. Zehn Producer (37%) erzeugten Hemmhöfe innerhalb des Indikatorrasens sowohl auf der 'Kontrollseite' der Platte, als auch auf der vormals mit Zellophan bedeckten Agarfläche, was den Beweis für eine Durchgängigkeit des Bakteriozins durch die Zellophanschicht und eine Größe bzw. Molekulargewicht kleiner als 15.000 D erbrachte. Die Hemmsubstanzen der restlichen 17 Producer (63%) dagegen, mußten schwerer sein als 15.000 D, da sie das Zellophan nicht passieren konnten und demzufolge nur einen Hemmeffekt auf der Kontrollseite der Platte aufwiesen. (Auch das Bakteriozin des Klebsiella-Stammes K 1 gehört in diese Größenordnung)

Tab. 10 faßt diese Ergebnisse zusammen.

Tab. 10 : Producer zellophangängiger bzw. zellophanundurchgängiger Bakteriozine

Producer zellophangäng. Bakt. ($< 15.000 D$) 10 Stämme = 37%	Prod. zellophanundurchgäng. Bakt. ($> 15.000 D$) 17 Stämme = 63%
36051, 40655 A, 40655 B,	R 1 (R 5I, R 6, R 7, R 11), R 12
37042, 9505, 1868, 5431,	26965, 1617, 9639, IFO 12552,
5173, 2262, 2846	11647, 15792, 4158, 25305, 25387,
	J 22, 26617, 30208, 30893, 36618,
(Indikatoren: Tab. 8)	ATCC 27225

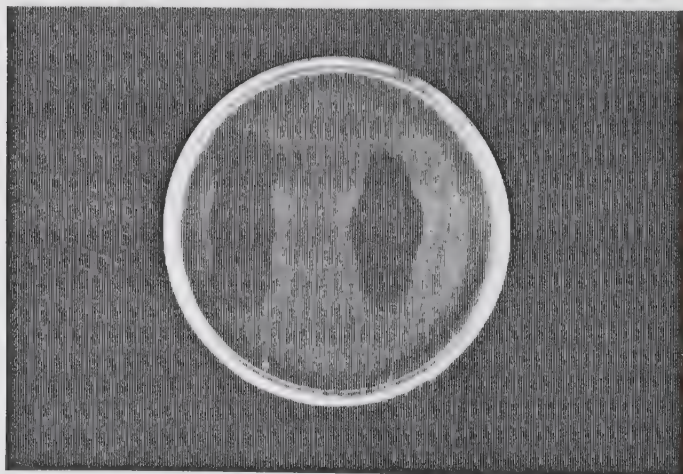
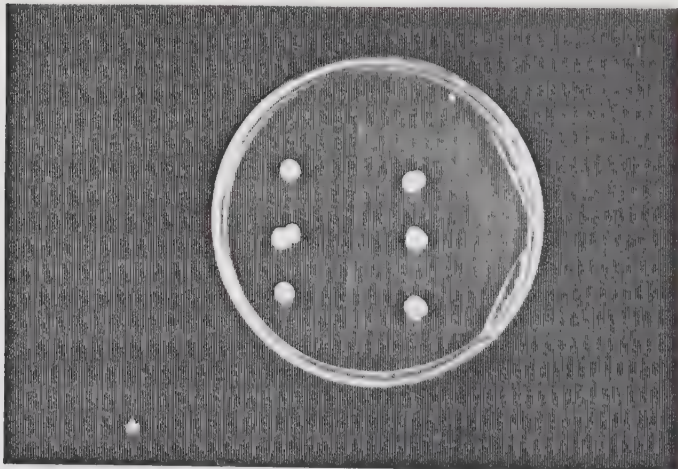
Die folgenden Abbildungen sollen den Versuchsaufbau verdeutlichen und zeigen jeweils drei bzw. zwei Vertreter der beiden verschiedenen Gruppen, einmal mit den aufgetragenen Producerkolonien und zum anderen nach Abziehen der Zellophanenschicht, sowie Überschichtung mit dem Softagar-Indikatorsystem. Ebenfalls abgebildet sind die beiden zum Kontrollstamm J 5 gehörigen Darstellungen, dessen Phagenschwanz größer als 15.000 D ist und somit nur ein Hemmhof auf der unbedeckten Agarfläche erzeugt wurde.

Abb. 9 - 14 : Zellophandurchgängigkeit verschiedener Bakteriozine

I. Producer : 9505, 36051, 2262

Indikator : 9006

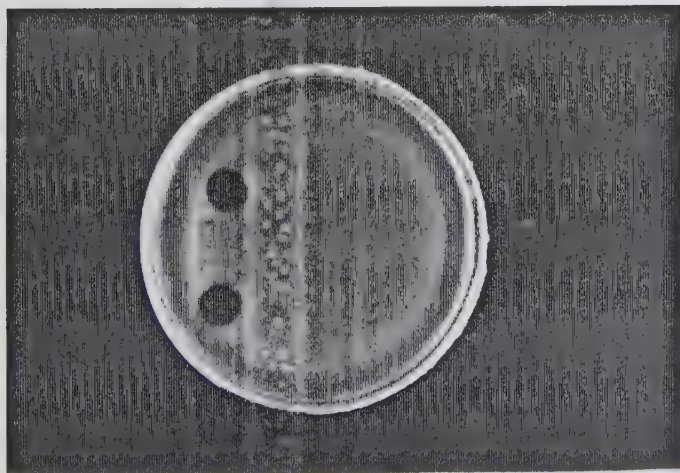
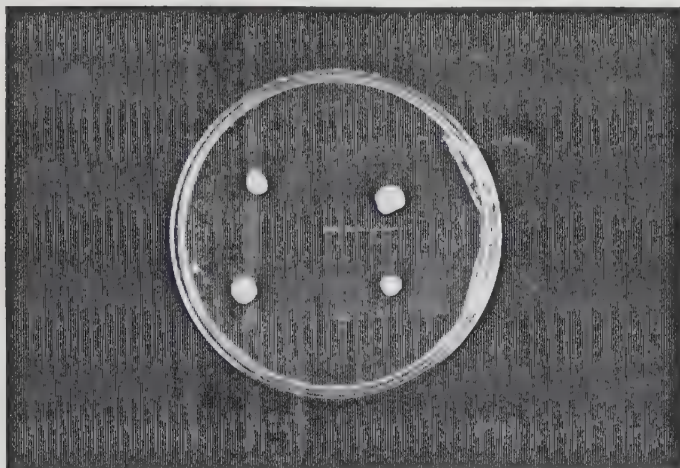
Ergebnis : Zellophandurchgängigkeit der Bakteriozine
(< 15.000 D)



II. Producer : 30208, 25305

Indikator : 26617

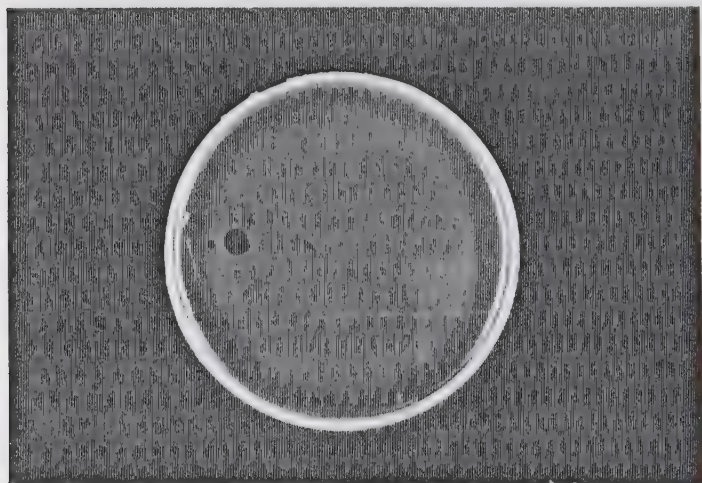
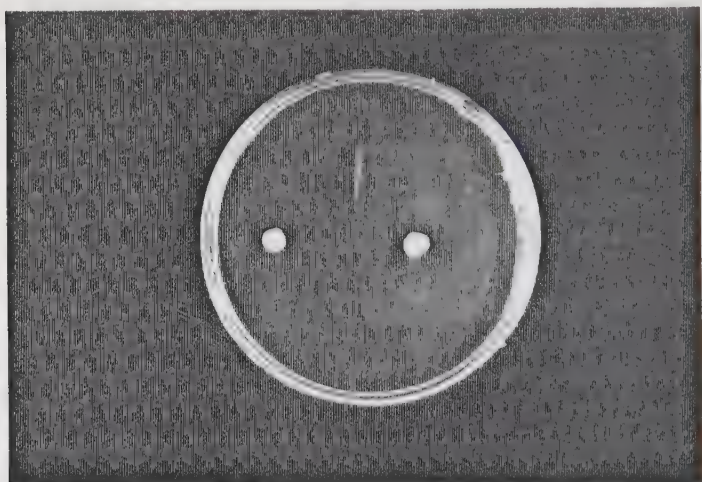
Ergebnis : Keine Zellophandurchgängigkeit der Bakteriozine
(> 15.000 D)



III. Producer : J 5

Indikator : J 38

Ergebnis : Keine Zellophandurchgängigkeit des Bakteriozins
(> 15.000 D)



4. Klassifizierung der Bakteriozine

Aufgrund der vergleichenden Betrachtung der Versuchsergebnisse bzgl. Temperaturverhalten, Trypsinempfindlichkeit und relative Größe bzw. Molekulargewicht der von den einzelnen Producern erzeugten Hemmsubstanzen, lassen sich drei verschiedene Typen von Bakteriozinen erkennen. Jede Bakteriozinart wird dabei einerseits von ganz bestimmten Producerstämmen gebildet und wirkt andererseits auf typische Indikatoren.

Tab.11 unterteilt die einzelnen Bakteriozintypen bezüglich ihrer Producer- bzw. Indikatoreigenschaften und gibt eine Zusammenfassung all ihrer Eigenschaften wieder. Die aus der Tabelle ersichtliche Überschneidung einzelner Indikatorstämme bzgl. der Empfindlichkeit für einen bestimmten Bakteriozintyp deutet auf das gleichzeitige Vorkommen mehrerer verschiedener Rezeptoren an der Zelloberfläche des jeweiligen Indikatorstammes hin.

TABELLE 11: KLASSIFIZIERUNG VON BAKTERIOZINEN BEI ACINETOBACTER CALCOACETICUS VAR. ANITRATUS

BAKT. TYP	PRODUCER	ANZAHL	PROZENT	INDIKATOREN	THERMO-STABILITÄT	TRYPSIN RESIST.	GROSSE (D)	CHLOROFORM RESISTENZ
A	R1 (=R51, R6, R7, R11), 1617, 9636, R12, 26965, IFO 12552 11647, 15792, 4158, 25305, 25387, 26617, 30208, 30893, 36618, J25, ATCC 27255	17	63	R2, R1 ETC, 20557, 25384, 9857, 15792, 26617, 30893, 31517, 1629, 3147, 11120, IFO 12552, 7372, 14159, IFO 13006, 26965, 1617, 9636, 11647, 4158, 25305, 25387, 26617, 30208, 30893, 36618, J25, 40824	-	-	>15000	+
B	9505, 36051, 40655 A, 2262, 40655 B, 1868, 37042, 5173, 5431	9	33,3	9006, 8404, 103, 109, 9857, 9678, IFO 13006	+	+	<15000	+
C	2846	1	3,7	25384, 14159, 26731, 40655A, 1640, 1868, 1676, 3082, 8908, 8527, 30508, 40655B, 4158, 26965, 9853, R1 ETC, 37042, 2201, 20557, 9636, 9857, 3147, 7372, 40824, 1617, 11120	+	-	<15000	+

E. DISKUSSION

I. Bakteriozine in Flüssigkulturen

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Producer- bzw. Indikatorstämme, sowie deren zugehörige Bakteriozine waren auf festem Nährmedium ermittelt worden (32). Keiner der insgesamt 27 verschiedenen Producerstämme zeigte jedoch Bakteriozinaktivität in flüssigem Medium, obwohl die Fähigkeit zur Bakteriozinbildung jedes einzelnen Producers vollständig erhalten war, wie das Aufbringen einer aus dem Flüssigansatz entnommenen Probe auf die Softagar-Indikatorschicht durch die Ausbildung eines Hemmhofes um diese Kolonien bewies.

Dieses Phänomen der Abhängigkeit einer Bakteriozinsynthese von den jeweiligen Wachstumsbedingungen der Producerbakterien wurde bereits bei Colicinen, Rettgerocinen oder auch grampositiven Producern beschrieben (11,33,36). Zur Erklärung dieser Beobachtung sind folgende Überlegungen möglich:

a. Die für eine Bakteriozinproduktion notwendigen Voraussetzungen liegen nur im festen Medium vor. Dabei wären vor allem unterschiedliche Wachstumsbedingungen der Producerkeime, etwa das Sauerstoffangebot in Betracht zu ziehen. Welche Faktoren nun definitiv über eine Bakteriozinproduktion unter den jeweiligen Verhältnissen entscheiden, muß dahingestellt bleiben, zumal auch die Verwendung eines, dem Wachstumsmilieu des Agars angenäherten Nährmediums kein positives Ergebnis erbrachte.

b. Eine Produktion von Bakteriozinen in Flüssigkultur findet zwar statt, jedoch werden diese nicht, wie im festen Medium, nach außen abgegeben, sondern bleiben zellgebunden. So können z.B. viele Bakteriozine grampositiver Producerkeime, in Abhängigkeit vom jeweiligen Nährmedium, in zwei verschiedenen Formen vorliegen, einer freien, sowie einer zellgebundenen Form (36). In diesem Fall wären die Bakteriozine zusammen mit ihren Producern abzentrifugiert worden und der für den

Nachweis verwendete Überstand zwangsweise bakteriozinfrei gewesen. Dabei hätte dann allerdings auch die vorgezogene Chloroformbehandlung nicht zu einem Ablösen der zellgebundenen Hemmsubstanzen geführt.

c. Der Producer gibt nicht nur seine Bakteriozine an das jeweilige Medium ab, sondern auch Inhibitoren dieser antibiotisch wirksamen Substanzen, wie z.B. Enzyme. Unter dieser Annahme wäre zum einen eine, im Vergleich zu festem Medium relativ vermehrte Bildung des Inhibitors in Flüssigkultur denkbar, zum anderen könnte auch die Betrachtung der unterschiedlichen Diffusionsmöglichkeiten in den einzelnen Medien eine Erklärung für den fehlenden Bakteriozinnachweis in Bouillon liefern. So kommt es in festem Medium durch die wahrscheinlich unterschiedliche Diffusionsfähigkeit der einzelnen Substanzen zu einer räumlichen Trennung der Bakteriozine und der diese inaktivierenden Stoffwechselprodukte desselben Producers, während Bakteriozine und Inhibitoren in flüssigem Medium in einer Art Suspension und somit engem Kontakt vorliegen.

Neben derartigen unspezifischen Mechanismen könnten jedoch auch ganz spezielle Inhibitoren zu einer Hemmung der Bakteriozinwirkung beitragen. So wurde z.B. ein Bakteriozininaktivator in Kulturüberständen von *Providencia rettgeri* gefunden, der schließlich als Lipopolysaccharid, also als Zellwandbestandteil und damit möglicherweise als ein in löslicher Form an das Medium abgegebener Bakteriozinrezeptor klassifiziert wurde (10). Obwohl dieser von bestimmten Producerstämmen gebildete Inaktivator gegen Rettgerocine anderer *Providencia rettgeri*-Stämme gerichtet war, wäre ein vergleichbarer Inhibitionsmechanismus des Producers gegen seine eigenen Bakteriozine denkbar, zumal sich auch an dessen Oberfläche dafür passende Rezeptoren finden (14,20,33). Zwei voneinander unabhängigen Arbeitsgruppen gelang es außerdem, ein sogenanntes 'immunity-protein' aus einem colicino-genem Bakterienstamm zu isolieren, das gegen das eigene Colicin gerichtet war (29,35). Dieses 'immunity protein' scheint die Grundla-

ge der Immunität eines Producers gegen sein eigenes Bakteriozin zu sein. Die hemmende Wirkung des 'immunity protein' wurde allerdings nur für in-vitro-Versuche dargestellt, d.h. eine Proteinsynthese aus einer Mischung aller dazu notwendigen Einzelkomponenten (z.B. Ribosomen) wurde durch das gemeinsame Einwirken von Colicin E 3 und dem 'immunity protein' im Gegensatz zu reinem Colicin E 3 nicht mehr verhindert; wurde die E 3 / 'immunity protein' - Mischung jedoch auf sensitive Indikatorzellen angewandt, konnte kein hemmender Effekt des 'immunity-proteins' mehr nachgewiesen werden, was die Vergleichsmöglichkeit mit unserem Fall einschränkt. Trotzdem könnte ein Inhibitor in dieser oder ähnlicher Form an einem Verlust der Bakteriozinaktivität in Bouillon beteiligt sein, ganz besonders in der Annahme, daß diese Stoffe vermehrt in Flüssigkultur gebildet und mit dem Bakteriozin zugleich freigesetzt werden.

Was auch immer der Grund für den fehlenden Nachweis einer Bakteriozinproduktion in flüssigem Medium ist, so bietet diese Tatsache doch wohl eine Erklärung für den Mangel an Literatur über Bakteriozine von *Acinetobacter calcoaceticus*, da sehr vielen Bakteriozinnachweisverfahren Flüssigmedien zugrunde liegen.

Vier der insgesamt 27 Producer erwiesen sich als Bakteriophagenträger, welche allerdings nur in Flüssigkulturen freigesetzt wurden. Dies wird bestätigt bei der Betrachtung der von Phagen in Proben der einzelnen 'Übergangsmedien' erzeugten Hemmhöfe, deren Quantität bzw. Qualität reziprok zur Viskosität des Mediums abnahm. Diese Hemmhofabschwächung, ausgehend von einer relativ klaren Aussparung im Indikatorrasen durch eine, aus der Flüssigkultur entnommene Probe, über immer trüber erscheinende Hemmhöfe, bis zu einem nur mehr angedeuteten Hemmeffekt, hervorgerufen durch Überstand aus einem bereits relativ zähflüssigem Medium, erbringt auf anschauliche Weise den Beweis für eine in erster Linie an flüssige Nährmedien gebundene Freisetzung von Bakteriophagen

demgegenüber steht die Bakteriozinproduktion dieser und auch aller anderen Acinetobacterstämme ausschließlich auf festem Medium.

In Bezug auf die vier Phagenproducer ließe sich dieses Phänomen evtl. mit der bei Colicinen gemachten Beobachtung einer Beeinträchtigung der Bakteriozinbildung bei gleichzeitiger Phagenproduktion, nach Art eines 'Konkurrenzkampfes', in Verbindung bringen (14) und so die ausbleibende Bakteriozinsynthese in Flüssigkultur erklären.

II. Bakteriozine in festem Nährmedium

1. Temperaturstabilität der Bakteriozine

Für jedes producerspezifische Bakteriozin wurde die Temperaturstufe festgelegt, bei der, nach 30-minütiger Einwirkung, keine hemmende Wirkung auf die jeweiligen Indikatoren mehr zu erkennen war. Dieser Temperaturbereich darf jedoch nicht als Fixpunkt absoluter, also 100%-iger Inaktivierung des Bakteriozins angesehen werden, da hierbei die jeweils unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Indikatoren ausschlaggebend ist, sondern lediglich als angenäherte Inaktivierungstemperatur. So konnte z.B. in einem Versuch, dem verschieden lange Einwirkungszeiten bestimmter Temperaturen auf ein spezielles Bakteriozin zugrunde lagen, die unterschiedliche Indikatorempfindlichkeit desselben Producers deutlich demonstriert werden und dabei eine Spannweite der 'Inaktivierungstemperatur' von ca. $\pm 5^{\circ}\text{C}$ verzeichnet werden. Die Ursache dieser Ergebnisse liegt wahrscheinlich in einer Teilinaktivierung des Bakteriozins ab einer bestimmten Temperatur, wobei dessen Restaktivität dann noch ausreicht, besonders empfindliche Indikatoren zu hemmen und somit die 'Inaktivierungstemperatur' in höhere Bereiche zu verlagern. Nachdem für die getesteten Producer sicherlich noch weitere, mir unbekannte Indikatorstämme existieren, wäre eine Verschiebung der, in dieser Arbeit angegebenen 'Inaktivierungstemperatur' durchaus denkbar.

Es gelang jedoch, die hier untersuchten Bakteriozine einwandfrei in drei verschiedene Temperaturtypen, einem thermostabilen, einem thermolabilen und einem Art 'Mischtyp' einzuteilen. Dieses 'Mischtyp-Bakteriozin' wurde nur von einem einzigen Producer (2846) erzeugt, der schon durch sein ungewöhnlich breites Indikatorspektrum auffällig war. Dieses Bakteriozin war bezüglich einiger Indikatoren schon bei 50°C inaktiviert, während eine andere Indikatorengruppe erst bei 110°C ungehemmtes Wachstum zeigte und der Rest der Indikatoren in mehreren, voneinander unabhängigen Versuchen zwischen diesen Temperaturen schwankte. Der dadurch aufkommende Verdacht, es handle sich hier um mehrere verschiedene Bakteriozine, wird aber zum einen durch das gleichsinnige Verhalten sämtlicher Indikatoren bezüglich der Trypsinempfindlichkeits- und Größentestung wieder entkräftet. Zum anderen scheinen gerade die, zwischen den beiden Temperaturen schwankenden Indikatoren ein Argument für die bereits erwähnte Hypothese der Teilinaktivierung eines Bakteriozins zu sein. Diese 'variablen' Indikatoren sind demnach als Indikatoren mittlerer Empfindlichkeit anzusehen, die je nach vorhandener Restaktivität des bakteriozinhaltigen Agars noch gehemmt werden oder schon normales Wachstum zeigen. Diese Restaktivität wird durch eine, von Versuch zu Versuch unterschiedliche, und zum Teil auch unbeeinflussbare Gesamtproduktion des Producers bestimmt. Bereits bei 50°C durchwachsende Indikatoren sind somit als schlechte, bis zu einer Temperatur von 110°C noch gehemmte Indikatoren als gute, also sehr empfindliche Indikatoren zu bezeichnen. Diese Überlegungen führten schließlich doch zu einer Einordnung des Producers 2846 in die thermostabile Gruppe von Bakteriozinen.

2. Trypsinempfindlichkeit der Bakteriozine

Im Gegensatz zu den Temperaturegebnissen reagierten sämtliche Indikatoren eines Producers vollkommen gleichsinnig. Erwies sich das Bakteriozin als trypsinempfindlich, was bei etwa 2/3 der untersuchten

Producerstämme der Fall war, so zeigten alle Indikatoren ungehemmtes Wachstum innerhalb der Producerfläche, während bei der zweiten Gruppe mit trypsinresistenten Bakteriozinen sämtliche Indikatoren nach wie vor gehemmt wurden. Diese Resultate sprechen in Bezug auf die trypsinempfindlichen Bakteriozine für eine absolute Inaktivierung der Hemmsubstanzen, ohne irgendwelche nachweisbare Restaktivität, während die proteaseresistenten Bakteriozine durch Trypsin überhaupt nicht angegriffen werden und ermöglichen somit eine klare Unterteilung der Bakteriozine.

3. Relative Größe der Bakteriozine

Die aufgrund mehrfacher Beobachtungen vermutete, sehr gute Diffusionsfähigkeit der zugleich thermo- und trypsinresistenten Bakteriozine wurde durch den Diffusionstest, mit Verwendung der gesamten Producerwachstumsfläche, bestätigt. Das bei dem Einzelkolonien-Diffusionstest erzielte, gegenteilige Ergebnis, ist wahrscheinlich auf geringere Bakteriozinsynthese dieser Einzelkolonien im Vergleich zu der von Producern mit Eiweißbakteriozinen zurückzuführen; erst bei einer genügend großen Menge an Bakteriozin, wie sie innerhalb des gesamten Producerrasens, mit sehr vielen Einzelkolonien, zustande kommt, wird die starke Diffusionsfähigkeit nachweisbar, was auf ein sehr kleines Bakteriozin schließen läßt.

Die Dialyse der gesamten Producerwachstumsfläche gegen NaCl und vor allem die Überprüfung der Zellophandurchgängigkeit ermöglichte, im Gegensatz zu dem mehr qualitativen und vergleichenden Prinzip der Diffusionsteste, eine auch quantitative Aussage über diese Hemmsubstanzen, zumal die Durchlässigkeit der verwendeten Dialysierschläuche entsprechend ihrer Porengröße auf eine Molekülgröße von 15.000 D beschränkt ist. Dabei wurde dann auch die Existenz von mindestens zwei verschiedenen Bakteriozintypen offensichtlich, wobei die eine antibio-

tisch wirksame Substanz kleiner, die andere Form größer als 15.000 D sein mußte.

Der Vergleich der Diffusionsfähigkeiten von thermo- und trypsinresistenten Bakteriozinen mit der des Producers 2846, welche beide zellphandurchgängig waren, führte schließlich auch zu einer eindeutigen Unterscheidung dieser beiden Stoffwechselprodukte bezüglich ihrer Größe, bzw. Molekulargewicht, wobei sich die trypsinresistenten Bakteriozine als noch erheblich kleiner darstellten.

III. Die Natur der Bakteriozine von *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* unter Berücksichtigung bereits bekannter Hemmsubstanzen

Die Überprüfung der Bakteriozine von 27 verschiedenen Producerstämmen auf biochemische, biophysikalische und biologische Eigenschaften, ermöglichte deren Unterscheidung und Eingliederung in drei verschiedene Bakteriozintypen, mit jeweils spezifischem Indikatorspektrum, von denen zwei (etwa 2/3 der Bakteriozine) aufgrund ihrer Trypsinempfindlichkeit als Eiweiße anzusehen sind, die sich wiederum bezüglich Größe und Temperaturverhalten differenzieren lassen. Der dritte, sehr kleinmolekulare Bakteriozintyp, mit einer leichten Bevorzugung von Lwoffii-Indikatoren, verfügt über hohe Hitzestabilität und führt, aufgrund seiner Trypsinresistenz, zum Ausschluß eines Proteincharakters. Allen drei Bakteriozintypen gemeinsam ist deren Chloroformresistenz und ihre an festes Nährmedium gebundene Produktion.

Die beiden erst genannten Bakteriozingruppen ähneln schon durch ihren Eiweißcharakter den Colicinen, wobei Typ A den 'klassischen Colicinen' die thermolabil (60°C , 30 min.), proteaseempfindlich und aufgrund ihres Molekulargewichtes von ca. 40.000 - 80.000 D langsam diffundierend sind, vergleichbar ist. Jedoch findet sich auch für Bakteriozintyp B eine Parallele innerhalb der Colicine: Colicin V, das sich, wie das

Bakteriozin des Stammes 2846, durch Trypsinempfindlichkeit, Hitzestabilität (100°C , 30 min.) und Zellophandurchgängigkeit auszeichnet (14, 20, 33).

In auffallendem Gegensatz zu den Colicinen, aber auch zu anderen bekannten Bakteriozinen, steht der dritte Bakteriozintyp C, der von ca. 1/3 der Acinetobacterstämme gebildet wird. Schon seine Trypsinresistenz distanziert ihn von den meisten, in der Literatur beschriebenen Bakteriozinen und macht einen Proteincharakter dieser Hemmsubstanz unwahrscheinlich. Das hieraus folgende Argument für ein wachstumhemmendes Bakteriophagenfragment, ähnlich der Pyocine (36), wird schon durch die sehr hohe Hitzestabilität entkräftet. Diese doch recht ungewöhnlichen Eigenschaften und die sehr geringe Größe unserer Bakteriozine finden jedoch trotzdem eine eventuelle Parallele in der Literatur. 1976 veröffentlichten Carlos Asensio et al. eine Studie über eine 'neue Familie kleinmolekularer Antibiotika von Enterobakterien', die sie 'Mikrozine' nannten (1). Diese Mikrozine wurden von gewissen E.coli-Stämmen in Minimalmedium produziert und erwiesen sich als methanollöslich, thermostabil (100°C , 30 min.), zellophandurchgängig und bis auf wenige Ausnahmen als proteasestabil (Pronase und Subtilysin). In weiteren Untersuchungen ergab sich eine Molekülgröße von etwa 1.000 D und schließlich die Codierung dieser Substanz durch spezielle Plasmide, ähnlich der Bakteriozine (2). Strukturell scheint es sich bei den wenigen proteaseempfindlichen Mikrozinen um Oligopeptide zu handeln, bei den anderen eventuell um Aminosäurederivate. Gerade die Thermostabilität, Zellophandurchgängigkeit, sowie die Trypsinresistenz der von uns gefundenen Hemmsubstanzen weisen doch deutliche Übereinstimmungen mit den sogenannten 'Mikrozinen' auf, weshalb man diesen Bakteriozintyp der Acinetobacter eventuell als mikrozinähnlich bezeichnen könnte.

F. ZUSAMMENFASSUNG

27 verschiedene Isolate von *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*, die in festem Nährmedium Bakteriozine synthetisierten, wurden auf eine Produktion dieser Stoffwechselprodukte in Flüssigkultur untersucht.

1. Keiner der 27 überprüften Producer synthetisierte die in Festkultur nachgewiesenen Bakteriozine auch in flüssigem Medium.
2. 4 der 27 Stämme (14,5%) erwiesen sich in der Flüssigkultur als Bakteriophagenträger

Die Bakteriozine der 27 unterschiedlichen Producerstämme wurden in Hinblick auf Temperaturbeständigkeit, Trypsinempfindlichkeit und Größenverhältnisse charakterisiert.

- 1.a. 17 von 27 Producern (63%) bildeten Bakteriozine, die nach 30-minütiger Einwirkungszeit von 50°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) keinen Hemmeffekt mehr zeigten.
- b. 9 von 27 Producern (33,3%) gaben Bakteriozine an das Medium ab, die auch bei 120°C noch aktiv waren.
- c. Einer der 27 Stämme produzierte ein Bakteriozin, das ab 50°C teilinaktiviert wurde und ab 30 Minuten bei 110°C keine Wachstumshemmung der Indikatoren mehr bewirkte.
- 2.a. 18 von 27 Producern (66,7%) bildeten tryptsinempfindliche Bakteriozine.
- b. 9 von 27 Producern (33,3%) verfügten über tryptsinresistente Bakteriozine.

3.a. 10 von 27 Keimen (37%) produzierten zellophandurchgängige Bakteriozine, die kleiner sein mußten, als 15.000 D.

b. 17 von 27 Producern (63%) bildeten Bakteriozintypen, die größer als 15.000 D und somit nicht zellophandurchgängig waren.

Die zusammenfassende und zugleich einordnende Darstellung sämtlicher Eigenschaften der 27 überprüften Bakteriozine, ergibt 3 unterschiedliche Bakteriozintypen von *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*.

1. Ein thermolabiles, trypsinempfindliches Bakteriozin, das größer ist, als 15.000 D. (bei 63% der Producer)
2. Ein thermostabiles, trypsinempfindliches Bakteriozin, dessen Molekulargewicht unter 15.000 D liegt. (bei 3,7% der Producer)
3. Ein thermostabiles, trypsinresistentes Bakteriozin, das kleiner als 15.000 D und zugleich kleiner als das thermostabile Eiweiß ist. (Produktion von 33,3% der Producer)

Alle Bakteriozine sind chloroformresistent.

Die beiden ersten Bakteriozintypen gehören aufgrund ihrer Eigenschaften zu den Bakteriozinen vom Colicin-Typ, während die dritte Art der *Acinetobacter*-Bakteriozine eine mikrozinähnliche Substanz zu sein scheint.

G. LITERATURANGABEN

1. Asensio C., J.C. Perez-Díaz, M.C. Martínez und F. Baquero:
A new family of low molecular weight antibiotics from Enterobacteria.
Biochem. Res. Comm. 69, 7 - 14 (1976)
2. Baquero F., D. Bouanchaud, M.C. Martínez-Perez und C. Fernandez:
Microcin Plasmids: a Group of Extrachromosomal Elements Coding for Low-Molecular-Weight Antibiotics in Escherichia coli.
J. of Bacteriology 135, 342 - 347 (1978)
3. Bauernfeind A., C. Petermüller und R. Schneider:
Bacteriocins as Tools in Analysis of Nosocomial Klebsiella pneumoniae Infections
J. of Clinical Microbiology 14, 15 - 19 (1981)
4. Bauernfeind A. und J.R. Burrows:
Suggested Procedure Allowing Use of Plastic Petri Dishes in Bacteriocin Typing.
Applied and Environmental Microbiology 35, 970 (1978)
5. Bauernfeind A., C. Petermüller:
Epidemiological Typing of Klebsiella by Bacteriocins.
Methods in Microbiology 14, T. Bergan and J.R. Norris (ed.) (1983)
6. Bauernfeind A., C. Petermüller:
Epidemiological Typing by Bacteriocins in Enterobacter cloacae.
J. of Clinical Microbiology (1984)
7. Bauernfeind A., C. Petermüller und J.R. Burrows:
Modifiziertes Verfahren zur Pyocintypisierung von Pseudomonas aeruginosa.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 240, 271 -278 (1978)
8. Bauernfeind A., C. Petermüller:
Cross-Infections with Pseudomonas aeruginosa.
XIII. International Congress of Microbiology, 8. - 13.10.1982, Boston, Massachusetts (USA)
9. Bauernfeind A., C. Petermüller:
Unveröffentlichte Ergebnisse
10. Baumgarten A.:
Charakterisierung antibakterieller Aktivität in Kulturüberständen von Proteus rettgeri.
Inauguraldissertation, Ludwig Maximilians-Universität, München (1981)
11. Baumgarten H.:
Klassifizierung von Bakteriozinen bei Proteus rettgeri und ihre Verwendbarkeit zur Stammtypisierung.
Inauguraldissertation, Ludwig Maximilians-Universität, München (1981)

12. Bergogne-Berezin E., M.L. Joly, N. Moreau und F. Le Goffic:
Aminoglycoside-Modifying Enzymes in Clinical Isolates of
Acinetobacter calcoaceticus.
Current Microbiology 4, 361 -364 (1980)
13. Bergogne-Berezin E., M.L. Joly-Guillon, F. Megrand und C. Verin:
In Vitro Activity of N-Formimidoyl-Thienamycin Compared with
Beta-Lactamase-Stable Compounds Against Clinical Strains of
Acinetobacter calcoaceticus.
Current Chemotherapy and Immunotherapy, Proc. 12th Internat'l.
Congr. of Chemotherapy, Florence, Italy 19. - 24. July 1981
14. Brandis H., J. Smarda:
Bacteriozine und bacteriozinähnliche Substanzen.
Fischer Verlag Jena (1971)
15. De Witt W., D.R. Helinski:
Characterization of colicinogenic factor E 1 from a noninduced
and a mitomycin C -induced *Proteus* strain.
J. mol. Biol. 13, 692 (1965)
16. French G.L., M.W. Casewell, A.J. Roncoroni, S. Knight und
J. Phillips:
A hospital outbreak of antibiotic-resistant *Acinetobacter ani-*
tratus: epidemiology and control.
J. Hospital Infect. 1, 125 -131 (1980)
17. Ghoneim A.T.M., A. Halaka:
Meningitis due to *Acinetobacter calcoaceticus* variant *anitra-*
tus.
J. Hospital Infect. 1, 359 -361 (1980)
18. Gilardi G.L. (ed.):
Glucose Nonfermenting Gram-Negative Bacteria in Clinical
Microbiology.
CRC PRESS, Inc.
19. Gilardi G.L.:
Antimicrobial Susceptibility as a Diagnostic Aid in the
Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacteria.
Applied Microbiology 22, 821 -823 (1971)
20. Hardy K.G.:
Colicinogeny and Related Phenomena.
Bact. Rev. 39, 464 - 515 (1975)
21. Henriksen S.D.:
Moraxella, *Acinetobacter*, and the Mimeae.
Bact. Rev. 37, 522 - 561 (1973)
22. Hinchliffe E., A. Vivian:
Naturally Occuring Plasmids in *Acinetobacter calcoaceticus*:
a P Class R Factor of Restricted Host Range.
J. Gen. Microbiology 116, 75 - 80 (1980)

23. Hoffmann S., C.E. Mabeck und R. Vejlsgaard:
Bacteriuria Caused by *Acinetobacter calcoaceticus* Biovars in
a Normal Population and in General Practice.
J. of Clinical Microbiology 16, 443 - 451 (1982)
24. Holton J., P.J. Shorvan:
Pneumonia caused by *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*.
J. of Infect. 4, 263 - 264 (1982)
25. Holton J.:
A report of a further hospital outbreak caused by a multi-
resistant *Acinetobacter anitratus*.
J. Hosp. Infect. 3, 305 - 309 (1982)
26. Imajoh Shinobu et al.:
The Receptor for Colicin E 3.
The J. of Biol. Chemistry 257, 6481 - 6487 (1982)
27. Jacob F., L. Siminovitch, E. Wollman:
Sur la biosynthese d'une colicine et sur son mode d'action.
Ann. inst. Pasteur 83, 295 - 315 (1952)
28. Jacob F., A. Lwoff. L. Siminovitch, E. Wollman:
Definition de quelques termes relatifs a la lysogenie.
Ann. inst. Pasteur 84, 222 (1953)
29. Jakes K., N.D. Zinder und T. Boon:
Purification and Properties of Colicin E 3 Immunity Protein.
The J. of Biol. Chemistry 249, 438 - 444 (1974)
30. Lennette E.H. (ed.):
Manual of Clinical Microbiology, 3. Auflage;
American Society for Microbiology, Washington D.C. (1980)
31. Murray B.E., R.C. Moellering jr.:
Evidence of Plasmid Mediated Production of Aminoglycoside-
Modifying Enzymes Not Previously Described in *Acinetobacter*.
Antimicrobial Agents And Chemotherapy 17, 30 - 36 (1980)
32. Rattenberger O.:
Bakteriozine bei *Acinetobacter calcoaceticus*.
Inauguraldissertation, Ludwig Maximilians-Universität,
München (1985)
33. Reeves P.:
The Bacteriocins
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1972)
34. Sabet S.F., C.A. Schnaitman:
Purification and Properties of the Colicin E 3 Receptor of
Escherichia coli.
The J. of Biol. Chemistry 248, 1799 - 1806 (1973)
35. Sidikaro J., M. Nomura:
E 3 Immunity Substance.
The J. of Biol. Chemistry 249, 445 - 551 (1974)

36. Tagg J.R., A.S. Dajani und L.W. Wannamaker:
Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria,
Bact. Rev. 40, 722 - 756 (1976)
37. Tatum H.W.:
Miscellaneous gram-negative bacteria.
in: J.E. Blair, E.H. Lennette and J.P. Truant (ed.)
Manual of Clinical Microbiology, 191 - 198 (1970)
American Society for Microbiology, Bethesda, Md.
38. Vivian A., E. Hinchliffe und C.A. Fewson:
Acinetobacter calcoaceticus: Some approaches to a problem.
J. of Hosp. Infection 2, 199 - 203 (1981)
39. Wendt L.:
Mechanism of Colicin Action: Early Events.
J. of Bacteriology 104, 1236 - 1241 (1970)

LEBENS LAUF

Ich wurde am 11.4.1960 als erstes Kind des Fachverkäufers Eduard Strauch und seiner Ehefrau Anna Maria, geb. Schmid, in Schrobenhausen geboren.

Dort besuchte ich von 1966 bis 1970 die Grundschule, wechselte dann auf das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium Schrobenhausen über und bestand im Juni 1979 mein Abitur.

Im Mai 1980 begann ich mein Medizinstudium an der Ludwig Maximilians-Universität in München, das ich am 21.5.1986 mit dem 3.Staatsexamen abschloß.

Seit 1.Juni 1986 bin ich als Assistenzarzt am Kreiskrankenhaus Schrobenhausen tätig.

